

وزارت جهاد كشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج كشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی كشور – پژوهشكده اكوئوژی دریای خزر

عنوان:
ایجاد بانک ژن ماهیان استخوانی

مجری مسؤل:
رضا پورغلام

شماره ثبت
۵۱۲۴۵

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان طرح : ایجاد بانک ژن ماهیان استخوانی

شماره مصوب طرح : ۱۴-۷۳-۱۲-۸۹۱۴

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : رضا پورغلام

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : رضا پورغلام

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : رضا پورغلام

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : فرامرز لالویی، محمد بینایی، مهدی نادری جلودار

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : مهدی یوسفیان

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -

محل اجرا : استان مازندران

تاریخ شروع : ۸۹/۱۰/۱

مدت اجرا : ۵ سال

ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۶

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ
بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح : ایجاد بانک ژن ماهیان استخوانی

کد مصوب : ۸۹۱۴-۱۲-۷۳-۱۴

شماره ثبت (فروست) : ۵۱۲۴۵ تاریخ : ۹۵/۱۲/۱

با مسئولیت اجرایی جناب آقای رضا پورغلام دارای مدرک تحصیلی

دکتری تخصصی در رشته بهداشت و بیماریهای آبزیان می باشد.

طرح توسط داوران منتخب بخش زیست فناوری و فرآوری آبزیان در

تاریخ ۹۵/۱۱/۳ مورد ارزیابی و با رتبه خوب تأیید گردید.

در زمان اجرای طرح مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
چکیده	۱
۱- مقدمه	۳
۱-۱- کلیات	۳
۱-۲- مروری بر تحقیقات انجام شده	۱۵
۱-۳- اهداف	۱۹
۲- مواد و روش کار	۲۰
۲-۱- نمونه برداری و استخراج DNA	۲۰
۲-۲- نمونه برداری و انجام انجماد اسپرم	۲۰
۲-۳- منطقه مورد مطالعه و موقعیت ایستگاه های رودخانه ها	۲۱
۳- نتایج	۲۲
۳-۱- بانک ژن	۲۲
۳-۱-۱- ماهی سفید	۲۲
۳-۱-۲- ماهی کلمه	۲۶
۳-۱-۳- ماهی آزاد	۳۰
۳-۱-۴- ماهی سس	۳۵
۳-۱-۵- ماهی سوف	۴۰
۳-۲- نتایج خصوصیات مولدین و ارزیابی نمونه های اسپرم تازه	۴۳
۳-۲-۱- نتایج بررسی اسپرمهای منجمد شده	۴۳
۳-۳- بررسی برخی از رودخانه های حوضه جنوبی دریای خزر	۴۶
۳-۳-۱- نتایج پارامتر های فیزیکی و شیمیایی آب در رودخانه های مورد مطالعه	۴۶
۳-۳-۲- نتایج بزرگ بی مهرگان کفزی	۵۵
۳-۳-۳- نتایج گونه های ماهیان	۶۲
۴- بحث و نتیجه گیری	۶۴
۴-۱- بانک ژن	۶۴
۴-۲- انجماد اسپرم	۷۵
۴-۳- تکثیر طبیعی	۷۵
پیشنهادها	۸۶
منابع	۸۷
چکیده انگلیسی	۹۴

چکیده

هدف از اجرای این طرح ایجاد بانک ژن ماهیان استخوانی دریای خزر، شناسایی ساختار ژنتیکی و جمعیت های ماهیان سس، سوف، کلمه، سفید و آزاد حوزه جنوبی دریای خزر با استفاده از روشهای مولکولی (ریز ماهواره ها) و تشکیل بانک DNA، ایجاد بانک انجماد اسپرم ماهیان استخوانی و امکان سنجی ایجاد زیستگاه طبیعی تخمیزی ماهیان استخوانی در معرض خطر دریای خزر به منظور حفظ تنوع زیستی و ژنتیکی بوده است. نتایج نشان داد که ساختار ژنتیکی ماهیان سفید، کلمه، آزاد، سس و سوف در گلستان (خلیج گرگان)، گیلان (سفید رود، کرگانرود، آستارا) و مازندران (تجن، تنکابن، سردآبرود، چالوس) متفاوت بوده و گروههای ژنتیکی مختلفی وجود دارد. ضمناً بانک DNA این گونه ها نیز تشکیل گردید.

ضمناً پس از تهیه نمونه اسپرم ماهی سفید و ماهی آزاد، کیفیت آن مورد ارزیابی قرار گرفت و فاکتورهایی چون درصد تحرک، مدت تحرک، تراکم، اسمولالیت و pH اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که درصد تحرک، مدت تحرک و میزان تراکم اسپرم در منی ماهیان آزاد بیشتر از ماهیان سفید و میزان اسمولالیت و pH اسپرم ماهیان آزاد کمتر از ماهیان سفید بود. در ارزیابی اسپرم منجمد شده نیز معلوم گردید، با گذشت زمان میزان درصد تحرک و مدت تحرک اسپرم هر دو گونه ماهی در مقایسه با نمونه تازه آن کاهش یافته است. همچنین درصد تحرک و مدت تحرک نیز در اسپرم ماهیان سفید از انجماد خارج شده کمتر از این فاکتورها در نمونه آزاد بود. نتایج نشان داد نمونه اسپرم ماهی سفید که به آنها اتیلن گلیکول اضافه شده بود بعد از خارج شدن از انجماد تحرک نداشته و همگی مرده بودند. در حالیکه نمونه هایی که به آنها گلیسرول اضافه شده بود، ماندگاری اسپرم کاملاً در آنها حفظ شده و سلولهای اسپرم تحرک داشتند. با توجه به نتایج بدست آمده، به نظر می رسد تفاوت های گونه ای امری بسیار مهم است که باید در روند فرآیند انجماد اسپرم کاملاً مد نظر قرار گیرد. همچنین با توجه به نتایج، استفاده از یک پروتکل منفرد و واحد جهت موفقیت در این امر شدنی نیست زیرا واکنش سلولهای اسپرم در برابر عوامل شیمیایی که بعنوان رقیق کننده به آنها افزوده میشود متفاوت است.

نمونه برداری از پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب، بزرگ بی مهرگان کفزی و فون ماهیان در هریک از رودخانه های مورد مطالعه (تجن، هراز، سردآبرود و چالوس) بصورت فصلی در ایستگاه های تعیین شده طی یک سال صورت گرفت. در مجموع ۵۳ تاکسون از بزرگ بی مهرگان کفزی در این رودخانه ها شناسایی شد. از ۱۵ گونه ماهی شناسایی شده ۶ گونه آنها غیر بومی بودند. ضمناً همه آنها گونه های ساکن رودخانه بوده و گونه های مهاجر از دریا به رودخانه صید نشدند. همچنین فراوانی نسبی گونه های ماهی مقاوم به آلودگی و شرایط سخت محیطی در تمامی رودخانه ها بیشتر از گونه های حساس بود. برآیند پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب، کدورت، مواد مغذی، شاخص های زیستی، گروه های کارکرد تغذیه ای و حضور و عدم حضور گونه های ماهیان نشان داد که از بالا دست تمامی رودخانه های مورد مطالعه به پایین دست آنها، کیفیت آب بصورت معنی دار کاهش یافته و امکان تکثیر طبیعی گونه های مهاجر که غالب گونه های در معرض خطر انقراض را

شامل می‌شوند در پایین دست رودخانه‌ها وجود ندارد. در سد شهید رجایی ساری بیشترین فراوانی نسبی گونه‌های ماهیان به ترتیب متعلق به سیاه‌ماهی *Capoeta capoeta*، سس‌ماهی *Luciobarbus capito* و ماهی سفید رودخانه‌ای *Squalius cephalus* بود. اکوسیستم دریاچه پشت سد و بالا دست آن، شرایطی را فراهم نموده که احتمالاً امکان معرفی و زیست برخی از گونه‌های در معرض خطر انقراض نظیر سس‌ماهیان به عنوان ذخیره گاه ژنتیکی برای حفظ تنوع زیستی وجود دارد.

کلمات کلیدی: تنوع زیستی، بانک ژن، انجماد اسپرم، تکثیر طبیعی، سد شهید رجایی، دریای خزر

۱- مقدمه

۱-۱- کلیات

امروزه تنوع ژنتیکی بعنوان نشانگر وضعیت اکولوژیک در مناطق، نواحی و قبایل متفاوت کاربرد داشته و ابزار منحصر بفرد و توانمندی جهت ارزیابی وضعیت و روند طولانی مدت جوامع زیستی (اعم از آبی و خشکی) می باشد. ارزیابی و کنترل اکولوژی اکوسیستمهای آبی، به نشانگرهای اکولوژیک نیاز دارد که در طیفی از معیارهای جهانی و جغرافیایی قابل تفسیر باشد. تنوع ژنتیکی بعنوان شاخص شرایط اکوسیستم و قابلیت برداشت منابع آبی است که با روشهای ژنتیک جمعیت قابل بررسی می باشد (Zhou et al., 2004).

طبق مطالعات، انجام آنالیز mtDNA می تواند تفاوت های ژنتیکی بین گونه ها و یا جمعیت های درون گونه را آشکار سازد و بنابراین از توان قابل ملاحظه ای جهت حل تناقض های رده بندی آبزیان برخوردار باشد (Nguyen & Nge, 2001). پلی مورفیسم mtDNA ابزار توانمندی جهت ارزیابی الگوهای جغرافیایی تکاملی ماهیان رود کوچ و آب شیرین می باشد (Thai et al., 2007). هتروزیگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در مطالعه ساختار جمعیت گونه ها دارد زیرا تامین کننده طیف وسیعی از ژنوتیپ به عنوان پاسخی به سازش پذیری در شرایط متغیر محیطی است و بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی مثل رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری را تحت تاثیر قرار می دهد. سطح تنوع ژنتیکی در هر گونه نسبت به گونه دیگر و در جمعیت های مختلف یک گونه که در هر منطقه می باشد متفاوت است. میزان تنوع در ماهیان آب شور بیشتر از ماهیان آب شیرین است و مقدار آن در ماهیان آنادروموس بینابین ماهیان آب شور و شیرین می باشد (Dewoody and Avise, 2000).

صید بی رویه موجب صدمه اکوسیستم های دریایی شده و حتی به از بین رفتن برخی گونه ها منجر شده است. به همین دلیل و با افزایش رشد جمعیت و نیاز به منابع دریایی، اهمیت مدیریت اصولی ذخایر روشن می شود. امروزه شناسایی گونه ها، زیر گونه ها و جمعیت های آبزیان از اهمیت زیادی برخوردار است چرا که علاوه بر مدیریت صحیح و بهره برداری مناسب موجب اجرای برنامه های اصولی جهت حفاظت از گونه ها یا جمعیت های با ارزش و بازسازی ذخایر خواهد شد. هدف مدیریت شیلاتی، حداکثر برداشت پایدار از ذخایر ماهیان است که دستیابی به این هدف نیازمند آگاهی از ذخایر این ماهیان می باشد. مارکرهای مولکولی و نشانگرهای DNA ابزار مناسبی هستند که بر اساس آن می توان جایگاه ژنی و کروموزمی ژنهای تعیین کننده صفات مطلوب را شناسایی کرد. پیشرفت علم و استفاده از نشانگرهای مولکولی مثل Microsatellite، RAPD، AFLP، RFLP و تعیین توالی که متاثر از فاکتورهای محیطی نمی باشد را جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر امکان پذیر کرده است (Ryman, 1991). بر اساس تعریف جمعیت، در یک اکوسیستم آبی هر فرد به عنوان یک خزانه ژنی محسوب می شود که عواملی همچون فاصله نسلیها، صید بی رویه، شرایط نامناسب آب و هوایی و از بین رفتن زیستگاهها

منجر به کاهش اندازه جمعیت‌های موثر و در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی ذخایر می‌گردد. چند گونه مهم از ماهیان استخوانی در این طرح مورد بررسی قرار گرفتند:

۱- ماهی سفید (*Rutilus frissi kutum*): عمدتاً در حوزه جنوبی خزر از رودخانه کورا واقع در ضلع غربی تا رودخانه اترک واقع در جنوب شرقی پراکنده است. در حوزه جنوبی دریای خزر ذخایر این ماهی در منطقه گیلان به مراتب بیشتر از منطقه مازندران و گلستان است. این ماهی در حوزه دریای خزر بیشتر در قسمت جنوبی و میانی دیده می‌شود و از این نواحی جهت تخم‌ریزی به رودخانه‌های دیناچال، گرگانرود، شلمان رود، فیدرود، تنکابن، شفلرود، حویق، لنگرود، آستارا، و غره وارد می‌شود، در قسمت آذربایجان وارد رودخانه اترک و کورا و تعداد بسیار کمی هم وارد دلتای رودخانه و لنگران می‌گردد. ماهی سفید نه تنها قبل از سن بلوغ به طور پیوسته در دریا زندگی می‌کند بلکه پس از رسیدن به سن بلوغ فقط به مدت کوتاهی آن هم صرفاً برای تخم‌ریزی به رودخانه‌های حوزه جنوبی مهاجرت می‌کند و بقیه ایام سال را برای تغذیه و رشد در دریا به سر می‌برد. ماهی سفید در دریا فقط در فصول مختلف با توجه به درجه حرارت آب و مواد غذایی موجود در بستر دریا و جریانهای دریایی محیطهای زندگی خود را تغییر داده و بنا به نیاز خود مهاجرتها را انجام می‌دهد. مطالعات انجام گرفته در طی سالهای متمادی در ارتباط با مهاجرت ماهی سفید نشان می‌دهد که مهاجرت پس از شروع سیر کولاسیون بهاره و با توجه به به حرارت هوا ممکن است از اواخر بهمن یا اسفند آغاز شود. ماهی سفید رفته رفته از نقاط عمیق دریا به ساحل مهاجرت می‌کند و با گرم شدن تدریجی آب در نقاط کم عمق بر میزان مهاجرت افزوده می‌شود به طوریکه در یک شرایط تقریباً مساعد و در اواخر اسفند ماه گله‌های ماهی سفید به سمت ساحل هجوم می‌آورند. در این هنگام ماهیانی که به سن بلوغ رسیده‌اند تمایل بیشتری به ساحل و آب شیرین رودخانه‌ها نشان می‌دهند و این ماهیان بنا به خواستگاه طبیعی خود رودخانه‌های مورد نظر را به منظور زاد و ولد تعقیب می‌نمایند. مهاجرت به رودخانه‌ها تا پایان تخم‌ریزی که عمدتاً تا اواخر اریب‌هشت ماه است ادامه دارد. آخرین آمار صید آن با احتساب صید خارج از کنترل ۸۱۲۸/۹ تن بود (سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۵).

۲- ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*): از توان سازگاری بالایی برخوردار بوده و در رودخانه‌ها و دریاچه‌های نواحی پست زندگی می‌کند. اصولاً آبهای با جریان بطئی را ترجیح می‌دهد هرچند در نه‌رهای با جریان سریع نیز مشاهده گردیده است. نسبت به تغییرات درجات حرارت مقاوم بوده و در آبهای با مقادیر نسبتاً اندک اکسیژن به زندگی خود ادامه می‌دهد. این ماهی آبهای لب شور را نیز تحمل کرده و در مناطق با شوری پایین نیز زندگی می‌کند. کلمه در شرایط مناسب تا دوازده سال زندگی می‌کند. در سواحل شمالی ایران، مرداب انزلی و خلیج گرگان مناطق مناسب برای ماهی کلمه می‌باشد. بطور کلی دو نوع مهاجرت برای کلمه شناخته شده است: الف- مهاجرت تولید مثلی که از دریا به رودخانه‌ها صورت می‌گیرد. بنظر می‌رسد درجه حرارت آب و طول روز در این نوع مهاجرت نقش داشته باشند. بطور کلی ماهیانی که در

قسمت شمالی دریای خزر زیست می کنند در فصل تخمیزی، زمانی که دمای آب کمتر از ده درجه سانتی گراد است به رودهایی چون ولگا، اورال، امبا و ترک مهاجرت می کنند و در سواحل جنوبی نیز به رود اترک و رودهای گرگانرود، قره سو، تالار، لاریم، شلمانرود و مرداب انزلی مهاجرت می کنند. ب- مهاجرت برای زمستان گذرانی: در اواخر تیر ماه، ماهیان کلمه بصورت متفرق در آبهای دور از ساحل در اعماق ۵-۶ متر پدیدار می گردند و در ماههای شهریور و مهر به سواحل نزدیک می شوند. در ابتدا دسته های متفرق هستند ولی از مهر ماه این دسته ها بهم می پیوندند و گله های متراکم، بزرگ و انبوهی را تشکیل می دهند. این گله ها به آهستگی به دلتای رودها نزدیک می شوند. هنگامیکه به عمق یک الی یک و نیم متر رسیدند به شکل توده های انبوهی در گودیاها به خواب زمستانی فرو می روند و نهایتاً در حوالی اسفند ماه وارد رودخانه می شوند. میزان صید آن در سال ۹۴-۹۵، ۳۸/۴ تن بود (سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۵).

۳- ماهی آزاد (*Salmo trutta caspius*): حوضه جنوبی دریای خزر در واقع نوعی قزل آلای قهوه ای است که به خاطر جثه ی بزرگ و محیط زیست دریایی آن، به ماهی آزاد دریای خزر معروف گردیده است (عمادی، ۱۳۶۴). ماهی آزاد دریای سفید حدود ۱۵-۱۰ هزار سال قبل به دریای خزر راه یافته و از آنجا به دو طریق مختلف به دریاها ی سیاه و آرال نفوذ کرده است (عمادی، ۱۳۶۴). ماهی آزاد در ایران در قسمتهای جنوبی، غربی و شمالی دریای خزر پراکنش دارد. این ماهی دریازی و رودکوچ بوده و در ایران برای تخمیزی به رودخانه های استان های گیلان، مازندران از جمله آستارا، کرگانرود، سفارود، ناورود، سفیدرود، صفارود، تنکابن، سردآبرود، چالوس، بابل رود و ... وارد می شود (عباسی و همکاران، ۱۳۷۸). ماهی آزاد بیشتر عمر خود را در دریا سپری می کند. پس از ورود به دریا، ۳-۵ سال در دریا تغذیه و رشد کرده و پس از رسیدن به سن بلوغ به رودخانه مادری مهاجرت می کند (کریم پور و حسین پور، ۱۳۶۷). آزاد ماهیان شکارچی و دارای رژیم گوشتخواری می باشند و جانوران ریز آبری را شکار می کنند و می بلعند. تغذیه ی بچه ماهیان آزاد در طبیعت ابتدا از زئوپلانکتون ها، لارو حشرات، پاروپایان، کرمها و سپس از بچه ماهیان ریز می باشد. پس از ورود به دریا از انواع ماهیان نظیر کیلکا ماهیان، گل آذین ماهیان، شگ ماهیان جوان، سایر بچه ماهیان و کفزیان تغذیه می کنند (Kazanchev, 1981). ماهیان آزاد در سن ۳-۴ سالگی و حداکثر ۵ سالگی بالغ می شوند (Kazanchev, 1981). ۴۵٪ ماهیان آزاد مهاجر به رودخانه ها را ماهیان نر و ۵۵-۵۰٪ آنها را ماهیان ماده تشکیل می دهند. بدین ترتیب نسبت تقریباً متعادلی از ماهیان نر و ماده جهت تکثیر به رودخانه ها کوچ می نمایند (کریم پور و حسین پور، ۱۳۶۷). مکان مناسب رودخانه برای تکثیر طبیعی این ماهی باید دارای مشخصاتی نظیر آب زلال، خنک، سرشار از اکسیژن و بستر سنگریزه ای و شنی (منطقه ایی لیتورال رودخانه) باشد. مولدین ماهی آزاد حوضه جنوبی دریای خزر ایران در آب با دمای ۱۰-۴°C و اشباع از اکسیژن بسته به شرایط رودخانه تکثیر می کنند. دمای بالای ۱۵°C باعث مرگ و میر تخمها می شود. تخمهای این ماهی درشت بوده، قطر متوسط آنها ۱.۵ میلیمتر و حداقل و حداکثر قطر تخم گزارش شده نیز ۴.۳ و ۱.۶ میلیمتر می

باشد. مدت زمان انکوباسیون تخمها بسته به شرایط دمای آب ۵۵-۳۰ شبانه روز طول می کشد (Kazanchev, 1981). ماهی آزاد دریای خزر از جمله ماهیان مهاجر رود رو و بومی دریای خزر می باشد (بریمانی، ۱۳۵۶). این ماهی دارای دو فرم بهاره و پاییزه می باشد. مهاجرت پاییزه این ماهی از ۱۵ شهریور تا ۵ آبان ماه انجام گرفته و برای تخم‌ریزی به رودخانه های کورا، ترک، سامور و رودخانه های کوچک سواحل جنوبی دریای خزر از جمله: آستارا، کرگانرود، شفارود، ناورود و به ویژه تنکابن مهاجرت می کند ولی در رودخانه های ولگا و اورال به ندرت دیده می شود. مهاجرت بهاره نیز در ماههای اسفند و فروردین انجام می گیرد و ماهیان خود را به قسمتهای بالادست رسانیده و چندین ماه را در آنجا به سر می برد. حدود ۷۰٪ ماهی های آزاد که جهت تخم‌ریزی به رودخانه های ایران کوچ می کنند دارای مهاجرت پاییزه (تخم‌دان رسیده) و ۳۰٪ دارای مهاجرت بهاره (نارس) می باشند. میزان صید آن در سال ۹۴-۹۵، ۷/۲ تن بود (سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۵).

۴- ماهی سوف (*Lucioperca lucioperca*): سوف معمولی مهمترین گونه از خانواده سوف ماهیان می‌باشد. علاوه بر سوف معمولی دو گونه سوف دریایی *Lucioperca marina* و سوف حاج طرخان *Perca flaviatilis* نیز در دریای خزر و در محدوده آبهای ایران صید می‌شوند ولی سوف معمولی بیشترین تعداد و گستردگی را نسبت به دو گونه دیگر دارد. ماهی سوف یکی از ماهیان بسیار مهم با گوشت سفید و خوش طعم و تقریباً بدون تیغ است. سوف معمولی دارای بدنی دراز که تا ۵۰-۱۲۰ سانتی متر و وزن ۶ تا ۱۰ کیلو گرم نیز می‌رسد. در آبهای ایران در زمان گذشته به مقدار زیاد در خلیج انزلی و مقدار کمی در خلیج گرگان صید می‌شد. ماهی سوف آب شور را بخوبی تحمل می‌کند ولی نسبت به آلودگی آب بسیار حساس است. سوف معمولی برای تخم‌ریزی در ماههای بهمن تا فروردین به رودخانه مهاجرت می‌کند. این ماهی در نقاط نسبتاً عمیق که بستر آن شنی و ماسه‌ای و از گیاه پوشیده شده باشد بر روی این گیاهان تخم‌ریزی می‌کند. تخم ماهی سوف ریز و بین ۲۰۰ تا ۳۰۰ هزار می‌رسد. سن بلوغ ماهی سوف جهت تولید مثل سال سوم زندگی است. نوزادان پس از تفریخ در رودخانه می‌مانند ولی از انبوه گیاهان آبی دوری می‌جویند زیرا امکان دارد که در میان این گیاهان سایر ماهیان درنده مانند اردک ماهی درکمین آنها باشد. مناطق اصلی تخم‌ریزی ماهی سوف در تالاب انزلی، خلیج گرگان و رودخانه سفیدرود بوده است. ماهی سوف در تمام کرانه ساحلی دریای مازندران گسترده بوده و لذا رقم چشمگیری را در صید سالیانه شیلات و شرکتهای تعاونی صیادی تشکیل می‌داد بطوریکه در سالهای ۱۳۰۶ تا ۱۳۱۳ میانگین صید آن ۳ هزار تن بوده است. صید این ماهی از آن پس با کاهش شدیدی همراه بوده بطوریکه در طی سالهای ۱۳۳۰ تا ۱۳۷۰ بجز در موارد نادر کمتر از ۲۵ تن بوده است. از سال ۱۳۶۹ تکثیر مصنوعی ماهی سوف انجام گردید و بمنظور کمک به حفظ این گونه با ارزش هر ساله میلیونها بچه ماهی سوف رهاسازی می‌گردد حاصل این فعالیت تغییر روند منحنی صید از حالت نزولی به وضعیت صعودی در سالهای اخیر است ولی صید آن دارای نوساناتی بوده است بطوریکه از ۲۰۷ تن در سال ۱۳۷۱ به ۹۵ تن در سال ۱۳۷۷ رسید و سپس صید کاهش یافته و به ۱۸ تن در سال ۱۳۷۹ رسید

اما در سال ۱۳۸۰ میزان صید مجدداً افزایش یافت. طی دوره ۱۰ سال ۱۳۸۰ - ۱۳۷۱ میزان صید بطور متوسط ۷.۲۳ تن بوده است. در حالیکه متوسط میزان صید طی ۱۰ ساله ۱۳۱۵ تا ۱۳۶۶ برابر ۲۶۶ تن بوده است. آنچه که در مورد ماهی سوف امید وار کننده است ضریب بازگشت نسبتاً مناسب این ماهی طی سالهای اخیر بوده است بطوریکه ضریب بازگشت آن طی سالهای ۷۴ و ۷۵ به ترتیب ۷ و ۱۰ درصد بوده است ولی آنچه که مایه تاسف است اینکه درصد بالایی از آنرا ماهیان غیر استاندارد تشکیل می دهند که توسط پره صیادی صید می شوند و به دلیل خاصیت حساس و ظریف این ماهی حتی با وضع قوانین محکم امکان برگرداندن آن به دریا ممکن نیست و ماهی تلف می شود. میزان صید آن در سال ۹۴-۹۵، ۶۶/۵ تن بود (سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۵).

۵- سس ماهیان (*Barbus brachycephalus*): گروهی از کپور ماهیان بزرگ آبهای شیرین هستند که با نام زردک نیز معروف هستند. تقریباً تمام خانواده دسته Barbus در مقایسه با کپور که بطور نمونه در لجنهای بستر استخرها و آبهای آرام ساکن می شوند، زرده پرها معمولاً در بسترهای شنی و سنگی در آبهای با جریان تند با حجم اکسیژن حل شده بالا یافت می شوند. سس ماهی پر بالغ طولی بین ۲۵ تا ۱۰۵ سانتی متر و وزنی بین ۲۰۰ گرم تا ۱۰ کیلوگرم دارد. اگرچه وزنه‌های حدود ۱ تا ۲ کیلوگرم بیشتر معمول هستند. اندازه زرده پرها در رودخانه های بزرگ از این نیز تجاوز می کند. این ماهیان بدنی کشیده داشته و از طرفین کمی فشرده هستند. همچنین سر و فلس های بزرگی دارند. نوعی از سس ماهی در حوضه خزر وجود دارد که سری پهن و اندازه ای بزرگ تر دارد اما اخیراً بسیار کمیاب است. نام Barbel از واژه لاتین Barba به معنی ریش یا هرگونه برآمدگی تیز شبیه مو استنتاج شده است که اشاره به حسگرهای مو مانند رشد کرده در طرفین دهان سس ماهی دارد. تخم ریزی عمدتاً از خرداد تا تیر انجام می شود. به طور گروهی وارد رودخانه می شوند و در نقاط کم عمق تخم ریزی می کنند. ۳ تا ۹ هزار تخم می گذارند که زرد رنگ و چسبناک است و به سنگ ها و گیاهان می چسبد. نسبت جنسی نر به ماده هفت به یک است. میزان صید آن در سال ۹۴-۹۵، ۲/۲ تن بود (سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۵).

انجماد اسپرم:

اولین بار Blaxter در سال ۱۹۵۳ توانست با روش نگهداری در حرارت پایین اسپرم شگ ماهی (*Clupea harengus*) را به مدت ۶ ماه زنده نگه دارد (Kerby, 1983; Kopeika et al. 2007). بنابراین نگهداری در سرما^۱ یا انجماد اسپرم، تکنیکی است که به عنوان بهترین ابزار برای نگهداری طولانی مدت اسپرم ماهی پیشنهاد می گردد. تاکنون انجماد اسپرم بطور موفقیت آمیزی در جهت نگهداری اسپرم در بیش از ۲۰۰ گونه از ماهیان آب شیرین و ۴۰ گونه از ماهیان دریایی در دنیا گزارش شده است (Gwo, 2000).

¹ - Cryopreservation

انجماد اسپرم نه تنها بخاطر صنعت تکثیر و پرورش مورد توجه است بلکه از نظر حفظ و بهبود ذخایر ژنتیکی نیز بسیار با اهمیت است. فواید این تکنیک را میتوان بدین ترتیب نام برد:

- ۱- هم زمان سازی قابلیت دسترسی به هر دو جنس (در موارد تاخیر رسیدگی جنسی بین نر و ماده)
- ۲- استفاده از کل حجم اسپرم موجود ۳- تهیه بصره اسپرم در هر زمان و مکان ۴- ساده نمودن مدیریت گله مولدین ۵- نقل و انتقال سلولهای جنسی در بین مراکز تکثیر و پرورش ماهیان ۶- ایجاد ذخیره یا بانک سلولی جهت برنامه بهگزینی و حفظ گونه ها (Cabrita et al. 2010).

اصولا سلولهای جنسی نر ماهیان بسیار متفاوت از سلولهای جنسی پستانداران است زیرا گامتهای نر در طیف وسیعی از ماهیان نه تنها قابلیت بارور سازی را فقط در محیط بیرونی داشته بلکه نیاز به یک عامل فعال سازی دارند به این معنی که اسپرم ماهیان تا هنگامیکه در مواجهه با آب قرار نگیرد تحرک نخواهد داشت و بعد از این مرحله تحرک خود را تنها در مدت زمان بسیار کمی حفظ می نماید (Day and Stacey, 2007). ماهیان تقریباً در تمام اکوسیستم آبی کره زمین که شامل دامنه ای از آب شیرین تا آب دریاچه های بسیار شور و از آبهای مناطق قطبی تا آبهای داغ صحرای کالیفرنیا زندگی میکنند. با توجه به تنوعی که در شرایط محیط زندگی ماهیان وجود دارد، این مسئله سبب تفاوتهای اساسی در خصوصیات شکلی و عملی آنها شده و در نتیجه آنها را مجبور نموده تا مکانیسمهای آدابتاسیون خود را با شرایط محیطی توسعه دهند و به این ترتیب بتوانند در شرایط محیطی مختلف بقا خود را حفظ کنند. همین مسئله سبب شده تا اسپرم گونه های مختلف ماهیان واکنشهای متفاوتی را به پروتکلهای انجماد اسپرم نشان دهند. (Day and Stacey, 2007).

با توجه به آنچه گفته شد، اگرچه موفقیت‌های زیادی در تهیه دستورالعمل‌های انجماد اسپرم ماهیان بدست آمده است، لیکن تهیه یک روش استاندارد معین که بتوان از آن برای تمام گونه های ماهیان آب شیرین و دریا استفاده نمود بسیار سخت است و این مسئله مربوط به این واقعیت است که انجماد اسپرم هر گونه ماهی شرایط خاص خود را دارا است. بطور مثال دستورالعمل کلی که برای انجماد اسپرم ماهیان توسط Kopeika و همکاران (۲۰۰۷) معرفی گردید هنگامیکه برای گونه های مختلف ماهی مورد استفاده قرار گرفت دچار دستکاریهای متعدد خصوصاً در ترکیب محیط مصرفی نگهداری اسپرم تحت شرایط انجماد گردید (Chewand Zulkafli, 2012).

شکل و ساختار اسپرم در ماهیان بسیار متنوع است. به همین دلیل امکان ایجاد یک گروه‌بندی مشخص برای ساختار اسپرم آنها نظیر آنچه که در پستانداران موجود است، وجود ندارد. تعداد تاژک اسپرم در ماهیان از یک تا دو تاژک متغیر است. طیف وسیعی از شکل و اندازه در آنها دیده شده و از نظر ساختار، تعداد و اندام محل نگهداری نیز بسیار متفاوت هستند. اصولاً ساختار اسپرم در ماهیان متأثر از روش تولید مثل آنها است (Sadiqul Islam and Akhter, 2011). اسپرمها سلولهای بسیار کوچکی هستند و تقریباً یک شکل کلی مشابه در تمام گونه های ماهی دارند. این سلول از سه بخش سر، بخش میانی و دم (تاژک) تشکیل شده است.

منی در واقع مجموعه ای از سلولهای جنسی (اسپرم) و مایع سمینال است. مایع سمینال (پلازما سمینال) دارای ترکیبی منحصر بفرد از مجموعه ترکیباتی است که بخشی از آنها نقش حمایت از اسپرم را به عهده دارند و بخشی دیگر موجب بهبود عملکرد سیستم تولید مثلی و اسپرم می شوند. مطالعات بر روی خصوصیات منی جهت فهم فرآیندهای بیوشیمیایی اصلی که در حرکت اسپرم و طی روند باروری اتفاق می افتند امری بسیار ضروری است. با این اطلاعات توانایی تولید مثلی گونه های مختلف ماهیان ارزیابی شده و روشهای نگهداری کوتاه و بلند مدت منی ماهیان تصحیح میگردد (Kowalski et al., 2003; Itoh et al., 2003; Ingermann et al., 2002). از مهمترین خصوصیات اسپرم جهت قابلیت باروری تحرک است. برخلاف اسپرم خزندگان و پستانداران، اسپرم ماهیان در مجرای سمینال^۲ بدون تحرک است. خاصیت اسمزی و ترکیبات مایع سمینال معمولاً مانع از تحرک اسپرم در مجرای اسپرم^۳ میگردد (Billard 1986). این مایع توسط مجرای اسپرم تولید می شود و حاوی یونهای است که موجب حفظ و بقا اسپرم بعد از آزاد شدن از بافت بیضه می گردد (Ciereszko 2008). مطالعات مختلف ارتباطات متعددی را بین ترکیب مایع سمینال و حرکت اسپرم در بعضی از گونه های ماهیان مانند ماهی آزاد اقیانوس اطلس، کپور معمولی، ماهی سیم، قزل آلا، رنگین کمان، قره برون و ماهی آزاد چینوک نشان داده است (Sadiqul Islam and Akhter 2011).

حرکت اسپرم معیاری مهم در تعیین کیفیت و قابلیت باروری منی است و پارامترهای مختلفی در این ارزیابی مورد استفاده قرار می گیرند. رایج ترین معیار مورد استفاده در این خصوص مدت زمان مورد نیاز برای فعال شدن حرکت اسپرم تا رسیدن به توقف نسبی حرکت است که به آن دوره تحرک^۴ نیز گفته می شود (Stoss 1983). در حرکت اسپرم ماهی چهار عامل کلیدی دخالت دارند که شامل فشار اسمزی (اسمولالیتی)، pH، درجه حرارت و غلظت یونهای سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم است که در بین آنها یونهای پتاسیم و کلسیم از اهمیت بیشتری برخوردار هستند. این عوامل موجب دیپلاریزه شدن غشا سلول اسپرم شده و قابلیت تحرک تاژک و در نهایت حرکت اسپرم را تحت تاثیر قرار می دهند (Morisawa et al., 1983).

الف - تاثیر درجه حرارت: دوره تحرک، قابلیت باروری و سرعت اسپرم بستگی به درجه حرارت محیط فعال سازی اسپرم و به تبع آن به درجه حرارت تانک نگه داری گله مولدین نر دارد (Williot et al., 2000). از آنجایی که منابع انرژی اسپرم ماهیان بسیار محدود می باشد، افزایش حرارت محیطی منجر به کوتاه شدن دوره تحرک و افزایش سرعت شده و برعکس کاهش حرارت محیط، موجب طولانی تر شدن دوره تحرک و کاهش سرعت اسپرم میگردد (Stoss 1983). این مسئله کاملاً تایید شده است که اسپرم ماهی کپور معمولی در حرارت ۲۰ درجه سانتیگراد نسبت به درجه حرارت ۲۶ یا ۳۰ درجه سانتیگراد دوره تحرک طولانی تری دارد. در کپور علفخوار دوره تحرک در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد به مراتب طولانی تر از زمانی است که اسپرم در حرارت ۳۰

^۲ - seminal tract

^۳ - sperm duct

^۴ - motility duration

درجه سانتیگراد قرار گرفته است (Jezierska and Witeska 1999) در ماهیان خاویاری سبیری دیده شده که دوره تحرک اسپرم هنگامیکه حرارت از ۱۰ به ۱۷ درجه سانتیگراد افزایش می‌یابد بطور محسوسی دوره تحرک اسپرم کاهش می‌یابد (Williot et al., 2000).

ب - تاثیر pH: این موضوع کاملا به اثبات رسیده است که pH خارج و داخل سلولی به اندازه ترکیب یونی محلول فعال سازی در شروع و طول دوره تحرک اسپرم موثر است (Márián et al., 1997). pH محیط خارج، احتمالا غلظت پروتون داخل سلولی را تحت تاثیر قرار داده که در نتیجه پتانسیل غشایی و در نهایت نحوه تحرک اسپرم را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Boitano and Omoto 1991, 1992). در قزل آلا ی رنگین کمان pH مایع سمینال معمولا ۸/۵ - ۷/۵ است. حرکت اسپرم ماهی کپور معمولی می‌تواند در محیطی با pH ۹ - ۶ آغاز شود. به عبارت دیگر pH داخلی اسپرم حدود یک واحد کمتر از pH خارجی آن است (Gatti et al., 1990; Redondo- et al., 1997; Muller et al., 1991; Perchec-Poupard et al., 1997).

ج - تاثیر یونها

۱- یون پتاسیم: در بین عواملی که قبلا از آنها یاد شد، غلظت یون پتاسیم در ترکیب با فشار اسمزی فاکتور کلیدی است که حرکت اسپرم را کنترل می‌کند و اجازه می‌دهد که اسپرم در آزاد ماهیان، ماهیان خاویاری و پهن ماهیان (paddle fish) حرکت خود را آغاز کنند (Linhart et al 2003a,b,c; Alavi and Cosson 2005; Krasznai et al 1995, 2000). از ۱۹۳۸ مشخص شده است که مقدار میلی مولار غلظت یون پتاسیم خارج سلولی در مجرای سمینال عامل اولیه جهت بی تحرک ماندن اسپرم آزاد ماهیان است. این نظریه بعدا توسط محققین دیگر مورد بررسی قرار گرفت و آنها نشان دادند که حرکت اسپرم آزاد ماهیان می‌تواند در محیط فاقد یون پتاسیم آغاز شود و غنی سازی محیط با یون پتاسیم مانع از تحرک اسپرم شده و شرایطی مشابه مایع سمینال ایجاد کند. این گروه از محققین همچنین نشان دادند بعد از قرار گرفتن اسپرم در محیط فاقد یون پتاسیم میزان cAMP در آنها سریعا افزایش یافته و بعد از چند ثانیه به یک میزان ثابت می‌رسد. هرچن غلظت خارج سلولی یون پتاسیم و cAMP به عنوان یک عامل موثر در حرکت اسپرم شناخته شده است لیکن چگونگی ارتباط آن دو هنوز نامشخص است. استفاده از مسدود کننده ای کانالهای پتاسیمی مانند Tetraethylammonium ، nonyltriethylammonium، یون باریم و سزیم می‌توانند از شروع تحرک در اسپرم ماهیان ممانعت به عمل آورند (Alavi and Cosson 2006). بنابراین، از نتایج ذکر شده در بالا در خصوص القا حرکت به اسپرم با تغییر غلظت یون پتاسیم، این نظریه که ممانعت از حرکت اسپرم آزاد ماهیان کاملا مرتبط با یون پتاسیم است تایید میگردد. به عبارت دیگر هیپرپلاریزاسیون غشا مستقیما با انتقال بین غشایی یون پتاسیم ایجاد شده و موجب آغاز حرکت در اسپرم آزاد ماهیان می‌شود (Kho et al., 2001).

در کپور ماهیان نیز یون پتاسیم حرکت و سرعت اسپرم را افزایش می‌دهد و بلوکه کننده‌های کانالهای پتاسیمی بطور قابل توجهی مانع تحرک تاژک اسپرم می‌شوند. قابلیت اثرات یون پتاسیم بر روی تاژک بدون غشا نیز

بررسی شده است و مشخص گردید که حرکت آکسونم مستقیماً با غلظت این یون کنترل می‌شود. تحقیقات نشان داده است که غلظت یون پتاسیم در رفتهای مورد استفاده برای انجماد اسپرم به شدت توانایی حرکت اسپرم کپور ماهیان را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Alavi and Cosson 2006).

تاکنون مکانیسم تنظیم کننده حرکت در اسپرم ماهیان خاویاری و پهن ماهیان (paddle fish) کاملاً شناسایی نشده است اما مشخص است که شباهت بسیار زیادی به مکانیسمهای موثر در حرکت اسپرم آزاد ماهیان دارد. در مطالعه‌ای Alavi و همکاران (۲۰۰۴) نشان داده اند که غلظت پتاسیم مایع سمینال اصلی ترین مهار کننده حرکت اسپرم ماهی قره برون است.

۲- یون کلسیم: تحرک اسپرم می‌تواند با تغییر غلظت یون کلسیم در بعضی گونه‌ها مانند کپور ماهیان تحریک شود زیرا غلظت سلولی خارج سلولی یون کلسیم شرط لازم برای آغاز حرکت اسپرم زنده است. Krasznai و همکاران (۲۰۰۰) متوجه شدند که حرکت اسپرم ۳۰ ثانیه بعد از افزودن 10^{-4} مول کلرید کلسیم به محلول شناوری حرکت خود را آغاز می‌کند. همچنین وقتی غشا اسپرم با افزودن $100 - \text{Triton X}$ از بین می‌رود آنها تحرک شدیدی را در برابر 10^{-6} و 10^{-5} مول یون کلسیم نشان دادند. ورامپیل^۵ یک بلوکه کننده کانالهای کلسیمی است که با افزوده شدن به اسپرم بالغ نیمه رقیق شده کپور با محلول فیزیولوژیکی (۱۴۰ میلی مول NaCl، ۱۰ میلی مول KCl، ۱ میلی مول CaCl_2 و ۲۰ میلی مول HEPES) مانع تحرک اسپرم شده است و این ممانعت با افزایش غلظت داخل سلولی یون کلسیم کامل میگردد. Krasznai و همکاران (۲۰۰۰) همچنین نشان دادند که سرازیر شدن یون کلسیم داخل سلولی از خلال کانالهای اختصاصی منجر به القا آزاد سازی یون کلسیم داخل سلولی از منابع ذخیره آن شده و تحرک اسپرم را از طریق سیستم کالمودولین^۶ فعال می‌کند. به غیر از ورامپیل دیگر بلوکه کننده های اختصاصی کانالهای کلسیمی (مانند فلوناریزین^۷ و خانواده کنوتوکسین^۸) نیز مانع از افزایش یون کلسیم داخل سلولی در کپور معمولی شده و در نتیجه مانع آغاز تحرک اسپرم می‌شود (Krasznai et al. 2003). در تیلاپیا^۹ نیز معلوم شده است که یون کلسیم داخل سلولی برای فعال سازی حرکت اسپرم مورد نیاز است و می‌تواند طول دوره تحرک آن را نیز طولانی نماید (Morita et al. 2003). پروبهای فلورسنت حساس شده یه یون کلسیم نشان داده است که افزایش غلظت یون کلسیم داخل سلولی یک اسپرم و یا گروهی از اسپرمها می‌تواند منجر به آغاز تحرک اسپرم شود. مشارکت یون کلسیم داخل سلولی و منابع داخلی آن سبب افزایش غلظت یون کلسیم داخل سلولی میگردد این موضوع سبب می‌گردد که وقتی حرکت اسپرم آغاز شد، این حرکت تثبیت شده و پایدار باقی بماند. آب رودخانه ای که اسپرم به آن وارد می‌شود حاوی $0.4 - 0.3$ میلی مول یون کلسیم

5 - Verapamil

6 - Calmodulin

7 - Flunarizine

8 - Conotoxin family

9 - *Oreochromis mossambicus*

است که این مقدار برای سرازیر شدن کلسیم از خلال کانالهای کلسیمی موجود در غشا پلاسمایی اسپرم در شرایط طبیعی و معمول کافی است (Sadiquil Islam and Aktar, 2011).

د - اثر فشار اسمزی بر تحرک اسپرم:

قرار گرفتن اسپرم در معرض محیطی با فشار اسمزی پایین^{۱۰} یا بالا^{۱۱} موجب تحریک حرکت در اسپرم می‌شود. اسپرم ماهیان آب شیرین هنگامیکه با یک محلول هیپواسموتیک رقیق می‌شوند تحرکشان آغاز می‌شود. اسپرم کپور ماهیان (ماهی حوض، کپور معمولی و ماهی قنات^{۱۲})، هنگامیکه منی آنها با محلولهای NaCl، KCl، مانیتول یا گلوکز با فشار اسمزی یکسان با منی (300 OsmKg^{-1}) رقیق می‌شوند همچنان بدون تحرک باقی می‌مانند. در حالیکه اسپرم در محیط حاوی همین ترکیبات ولی با فشار اسمزی کمتر از مایع سمینال ($<200 \text{ OsmKg}^{-1}$) رقیق شود شروع به حرکت میکند. این مسئله نشان می‌دهد که اسپرم تحت فشار اسمزی مایع سمینال است که در مجرای اسپرم بدون تحرک باقی می‌ماند و در شروع تخم‌ریزی به داخل آب شیرین که همراه با کاهش اسمولالیت است، حرکت خود را آغاز میکند (Morisawa et al. 1983). مواجهه اسپرم با آب دریا که هیپراسموتیک است، نیز موجب تحریک حرکت در اسپرم ماهیان دریایی می‌گردد (Oda and Morisawa, 1993; Takai and Morisawa, 1995).

اسپرم پفک ماهی دریایی در مایع سمینالی با فشار اسمزی در حدود 300 OsmKg^{-1} بدون تحرک است، لیکن هنگامیکه اسپرم در مواجهه با افزایش اسمولالیت محیط پیرامون خود قرار می‌گیرد (1200 OsmKg^{-1}) شروع به حرکت میکند (Takai and Morisawa, 1995). این شوک هیپراسموتیک می‌تواند بخاطر افزایش غلظت داخل سلولی یونهای پتاسیم و کلسیم و کاهش pH داخل سلولی باشد (Oda and Morisawa, 1993; Takai and Morisawa, 1995). این موارد مجموعه‌ای از تفاوتها را در بین ماهیان مختلف جهت آغاز تحرک اسپرم نشان می‌دهد. اخیراً مشخص شده است که تحرک اسپرم ماهی مداکا^{۱۳} که برای زندگی عادت به آبهای بسیار شور دارد در طیف وسیعی از تغییرات فشار اسمزی شامل آب دیونیزه (25 OsmKg^{-1})، HBSS هیپوتونیک، ایزوتونیک و هیپرتونیک با اسمولیت هایی شامل $686 - 92 \text{ OsmKg}^{-1}$ اتفاق می‌افتد (Yang and Tiersch, 2009). در تیلاپیا نیز که عادت به زندگی در آبهای شور، تحرک اسپرم تابع همین شرایط است منتها دامنه فشار اسمزی محدودتر است (Morisawa and et al. 1983).

مهمترین اصل در انجماد اسپرم ایجاد دهیدراتاسیون سلولی و به حداقل رساندن ضایعات ناشی از کریستالهای یخ در سیتوپلاسم و دیواره سلول اسپرم است. بیشترین آسیب ناشی از انجماد می‌تواند در ارتباط با فرآیند فریز شدن و از فریز درآمدن سلول طی روند انجماد اسپرم رخ دهد، زیرا طی مرحله فریز شدن شوک سرمایی و طی از

10 - Hypo- osmotic

11 - Hyper - osmotic

12 - Crucian carp

13 - *Oryzias latipes*

فریز درآمدن شوک گرمایی ایجاد شده میتواند به سلول اسپرم آسیب بزند. آسیب ناشی از سرما طی مرحله قبل از فریز^{۱۴} و مرحله پس از درآمدن از فریز^{۱۵} که در دامنه حرارتی بین ۴۰- تا صفر درجه سانتیگراد است رخ می-دهد، ایجاد میگردد (Muchlisin, 2005). با توجه به آنچه گفته شد در روند انجام انجماد اسپرم برای به حداقل رساندن آسیب به اسپرم نیاز به ترکیباتی است که استفاده از آنها در این فرآیند امری ضروری است. این ترکیبات را تحت عنوان رقیق کننده‌ها^{۱۶} و ماده محافظ از سرما^{۱۷} می‌نامند که عبارتند از:

الف - رقیق کننده‌ها: رقیق کننده‌ها در فرآیند انجماد اسپرم بسیار مورد بررسی و تحقیق قرار گرفته‌اند زیرا فرآیند انجماد بدون آنها تقریباً غیرممکن است. یک رقیق کننده ماده‌ای است که غلظت اسپرم را کم نموده و موجب می‌شود حجم بیشتری از اسپرم جهت انجام تکثیر مصنوعی و یا سایر فعالیتهای تحقیقاتی بدست آید (Muchlisin, 2004). اصولاً منی ماهی از ویسکوزیته بالایی برخوردار است و در مواردی تنها بخش کوچکی از آن جهت انجام تکثیر مصنوعی مورد نیاز است. رقیق کننده‌ها نقش حیاتی در انجماد بازی می‌کنند. آنها نه تنها برای رقیق نمودن اسپرم مورد نیاز هستند بلکه معمولاً موجب القا تحرک اولیه در اسپرم شده و قدرت باروری اسپرم منجمد را افزایش می‌دهند (Muchlisin, 2005).

ب - ماده محافظ از سرما: مانند رقیق کننده‌ها، مواد محافظ در برابر سرما نیز نقش بسیار مهمی در انجماد اسپرم خصوصاً در انجمادهای طولانی مدت بازی می‌کنند. در واقع این مواد کمک می‌کنند تا سلول اسپرم از شوکهای حرارتی سرد و گرم در طی فرآیند انجماد محافظت شده و نیز از دهیدراتاسیون حاد ممانعت به عمل می‌آورند. این مواد ممانعت از عملکرد برخی آنزیمها مانند کاتالاز نموده و در عین حال موجب پایداری پروتئینها در محلولهای آبی میشوند. همچنین می‌توانند مانع شکل‌گیری یخ طی مرحله قبل از فریز شوند اما در همین حال میتوانند برای سلولی که فریز نشده است کشنده و سمی باشند (Chao, 1996). باید در نظر داشت که این مواد می‌توانند اثرات مضر داشته و در حرارتهای بالا سبب دناتوره شدن پروتئینها شده و در نهایت موجب مرگ سلولی شوند. متأسفانه سمیت این ترکیبات یکی از عوامل محدود کننده اصلی در موفقیت آمیز بودن انجماد اسپرم در ماهیان است (Muchlisin, 2005). از آنجایی که سلولهای اسپرم بسیار حساس بوده و به راحتی تحت تاثیر رقیق کننده‌ها و مواد محافظ سرما قرار می‌گیرند، مطالعات زیادی در این خصوص صورت گرفته تا بهترین رقیق کننده و ماده محافظ معرفی گردد. مطالعات نشان داده است که طی فرآیند انجماد چنانچه از مواد محافظ سرما استفاده نشود میزان بازمتدگی اسپرمهای زنده به شدت کاهش می‌یابد. در هنگامیکه روند انجماد اسپرم بسیار کند و آرام صورت می‌گیرد افزودن این مواد به منی موجب محافظت سلولهای اسپرم در برابر سرما میگردد (Chao, 1996; Muchlisin, 2005).

14 - Pre - freezing

15 - Post - thawing

16 - Extender

17 - Cryoprotectants

ج - کیفیت اسپرم اولیه: پروسه انجماد اسپرم موفقیت خود را تا حدود زیادی مدیون کیفیت اسپرم اولیه است. بطور کلی یک اسپرم با کیفیت در میانه فصل تکثیر از ماهیان مولد بدست می‌آید و کیفیت آن با نزدیک شدن به پایان فصل تکثیر کاهش می‌یابد. این موضوع در قزل آلا، شگ ماهیان و سایر گونه‌ها به اثبات رسیده است. مهمترین ابزار جهت شناسایی کیفیت اسپرم ارزیابی قدرت تحرک آن است. مطالعات نشان داده است که حداقل میزان تحرک در ارزیابی مناسب بودن اسپرم جهت انجماد ۸۰٪ است. برای مثال در ماهیان خاویاری استفاده از اسپرمی که دامنه تحرک آن کمتر از ۴۰٪ است به هیچ عنوان مناسب انجماد نیست (Kopeika, 1999). (Cherepanov and

موضوع مهم دیگر در حفظ کیفیت اسپرم ممانعت از آلوده شدن آن با آب، ادرار و مدفوع ماهی در زمان گرفتن اسپرم است. نشان داده شده که بی دقتی در گرفتن اسپرم از ماهی آزاد سالمون که با فشار دادن ناحیه شکمی انجام شده موجب گردیده که اسپرم تا ۸۰٪ با ادرار ماهی رقیق گردد. آلودگی اسپرم با ادرار موجب تغییر در اسمولالیت، کاهش در غلظت یون پتاسیم و در نهایت تحرک اسپرم میگردد. آلودگی ادرار با اسپرم به نسبت ۲۵٪ موجب تقلیل تحرک اسپرم تا یک سوم بعد از انجماد اسپرم در مقایسه با اسپرم عاری از ادرار شده است (Lahnsteiner, 2000). آلودگی اسپرم با خون و مدفوع نیز موجب کاهش کیفیت اسپرم میگردد و این امر زمان ماندگاری اسپرم تحت شرایط انجماد را کاهش می‌دهد. وجود آلودگیهای باکتریایی نیز تاثیر مستقیمی بر کیفیت اسپرم میگذارد و در مواردی آنتی بیوتیک تراپی در این خصوص توصیه شده است (Day and Stacy, 2007).

اکوسیستم دریای خزر با تنوع گونه ای بالا، گونه های انحصاری و داشتن آب لب شور دارای اهمیتی خاص است اما عواملی باعث تهدید تنوع زیستی ماهیان این منطقه مهم شده اند. تاکنون با در نظر گرفتن ماهیان غیر بومی در این منطقه ۵۳ جنس و ۷۹ گونه، متعلق به ۱۸ خانواده و ۱۰ راسته شناسایی شدند. از میان ماهیان شناسایی شده اغلب ساکن آب شیرین (رودخانه ها و تالابها) می باشند و حدود ۲۳ درصد از آنها را ماهیان مهاجر از دریا به رودخانه تشکیل می دهند. فراوانی ماهیان غیر بومی در سالهای اخیر برای توسعه پرورش ماهی و یا تصادفی به همراه سایر گونه های پرورشی و احداث کانال ولگا دن در این منطقه افزایش یافته اند و حدود ۱۷ درصد از گونه های این منطقه را به خود اختصاص داده اند. ۴۴ درصد از گونه های ماهیان این منطقه قابلیت بهره برداری اقتصادی دارند. ۲۴ درصد از گونه های ماهیان این منطقه، انحصاری دریای خزر بوده و در سایر نقاط دنیا وجود ندارند. این گونه ها به لحاظ حفاظتی دارای ارزش ویژه ای بوده، ضمن آنکه از خصوصیات ویژه این اکوسیستم منحصر به فرد بوده و می بایست نسبت به حفاظت از آنها تمهیدات خاصی صورت گیرد. وضعیت حفاظتی گونه ها بر اساس طبقه بندی موسسه جهانی حفاظت از طبیعت (IUCN) مشخص شده است. احتمالاً بر اساس ملاک های بین المللی گونه های کمی در طبقات شدیداً در معرض خطر انقراض و یا آسیب پذیر قرار می گیرند. اما با ملاک های ملی و منطقه ای (حوضه جنوبی دریای خزر)، گونه های نسبتاً زیادی در منطقه در معرض تهدید

قرار گرفتند. بر این اساس ۶ درصد از گونه های این منطقه شدیداً در معرض خطر انقراض هستند، ۲۱ درصد نیازمند حفاظت بوده و تنها ۳۶ درصد وضعیت خوبی دارند (عبدلی و نادری جلودار، ۱۳۸۷).

تخریب زیستگاهها مخصوصاً برای ماهیانی که مهاجر بوده و در رودخانه تولید مثل می کنند و صید بی رویه گونه های اقتصادی از عوامل مهم در خطر انقراض قرار گرفتن گونه های ماهیان این منطقه می باشد. در نتیجه رودخانه های حوضه جنوبی دریای خزر نقش بسزایی در بقا ماهیان شیلاتی دارند که متأسفانه در سالهای اخیر دستخوش تغییرات زیادی شدند (ساختن سد، تخریب بستر، آلودگی به فاضلابهای کشاورزی، شهری، صنعتی و ...) و ضمن تهدید نسل بسیاری از گونه های ماهیان مهاجر، بقا بسیاری از گونه های ساکن در این رودخانه را نیز با خطر مواجه ساخته است.

شهرنشینی، فعالیت های صنعتی و کشاورزی با همه مزایایی که در افزایش تولید داشته است، همواره با آثار مخرب خود از طریق ایجاد آلاینده ها و پساب ها، سلامت اکوسیستم ها به ویژه آب های سطحی را به مخاطره می اندازند (Karr, 1998). آلودگی آب رودخانه ها را در حقیقت می توان شاخص آلودگی محیط زیست در اثر فعالیت های انسانی به حساب آورد، زیرا رودخانه ها تنها منابع آبی هستند که مسیر طولانی را از میان شهرها، روستاها و مناطق صنعتی و کشاورزی طی می کنند (Sharma and Chowdhary, 2011). با توجه به این موضوع ۳ نوع آلودگی شامل آلاینده های صنعتی ناشی از کارخانجات و صنایع، آلودگی کشاورزی حاصل از سموم کشاورزی مورد استفاده در مزارع کشاورزی و آلودگی شهری شامل فاضلاب های خانگی و شهری می باشد و بر این اساس ۳ منبع آلاینده وارد رودخانه ها می شوند (Qane, 2004).

رودخانه تجن یکی از رودخانه های مهم حوضه جنوبی دریای خزر به لحاظ فون ماهیان بوده و بیش از یک سوم گونه های ماهیان این حوضه در این رودخانه گزارش شدند (نادری جلودار، ۱۳۷۸). رودخانه های سردابرو و چالوس دو رودخانه حفاظت شده بوده و به لحاظ تنوع فون ماهی و شرایط زیستگاهی در مقایسه با سایر رودخانه های حوضه از شرایط نسبتاً مطلوب تری برخوردار می باشند. رودخانه حفاظت شده هراز نیز در کنار دو رودخانه سردابرو و چالوس در گذشته سابقه حضور خوب برخی از گونه های ماهیانی که در حال حاضر مورد تهدید واقع شده اند را داشت. ضمن این که این رودخانه ها علیرغم طول کوتاه شان، تمامی نواحی اکولوژیک را دارا بوده و با احیای آنها، می توانند نقش موثری در حفظ تعداد بیشتری از گونه های ماهی را داشته باشند. عدم اطلاعات مستمر و بعضاً پراکنده از تغییرات این اکوسیستم مهم، سبب شده است تا اعمال مدیریت صحیح در این منطقه امکان پذیر نباشد.

۲-۱- مروری بر تحقیقات انجام شده

مطالعات مولکولی جمعیت های ماهیان در داخل کشور متجاوز از ۳۵ سال پیش آغاز گردیده است (Froufe et al., 2002) در ابتدا الکتروفورز ژل نشاسته با رنگ آمیزی هیستوشیمیایی همراه بود که اولین مارکرهای ساده ژنتیکی

در بررسی جمعیت‌های طبیعی محسوب می‌شود. با توجه به گسترش و پراکندگی کپور ماهیان مطالعات گسترده‌ای بر روی این ماهیان صورت گرفته است. رضوانی و همکاران (۱۳۸۵) تنوع ژنتیکی ۵ گونه از کپور ماهیان (ماهی سفید، سس، ماش، سیم و کلمه) به روش RFLP مورد بررسی قرار داده که ۵ آنزیم از ۱۳ آنزیم مورد استفاده الگوهای چند شکلی را برای هر یک از گونه‌ها نشان داده است. در بررسی دیگر جمعیت ماهی کلمه دریای خزر با استفاده از آنالیز RFLP مورد مطالعه قرار گرفته است (Rezvani et al., 2007). محصول PCR نمونه‌های کلمه جمع آوری شده از دو منطقه بندر انزلی و بندر ترکمن با ۱۳ آنزیم اندونوکلاز مورد هضم آنزیمی قرار گرفت که در مجموع ۴ هاپلوتیپ متفاوت شناسائی گردید (Rezvani et al., 2007). آنالیز شبیه سازی با هزار بار تکرار، تفاوت معنی داری بین هاپلوتیپ‌های مناطق مختلف نشان نداده است ($p \geq 0.05$).

علاوه بر مطالعات فوق، جمعیت سس ماهی بزرگ سر، نیز به روش PCR-RFLP در آبهای حوضه جنوبی دریای خزر انجام شد که نتایج حاصله پدیده پلی مورفیسم را در نمونه‌های مورد بررسی نشان نداد (لالویی و همکاران، ۱۳۸۲)، همچنین مطالعات متعددی با روش RFLP در مورد کیلکا ماهیان (لالویی و همکاران، ۱۳۸۵) انجام شد. خارا (۱۳۸۳) با بررسی ناحیه ای در میتوکندری با طول ۳۵۰۰ جفت باز توانست جمعیت وارداتی سیم (*Abramis brama*) از آذربایجان را از جمعیت‌های بومی جدا کند. با استفاده از این روش میزان تنوع درون گونه‌ای جمعیت سیم تالاب انزلی و دریای خزر صفر و در نمونه‌های ارس خیلی پایین بود که دلیل آن کاهش ذخایر این گونه عنوان گردید. Keyvan shokoh و همکاران (2007)، با استفاده از ۶ جایگاه ریز ماهواره ای تنوع جمعیتی کلمه تالاب انزلی و خلیج گرگان را مورد بررسی قرار دادند و به وجود اختلاف ژنتیکی در جمعیت‌های مورد مطالعه پی بردند.

ریحانی (۱۳۸۷) در بررسی ساختار جمعیتی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) جمعیت این ماهی در روسیه را متفاوت از جمعیت‌های انزلی و خلیج گرگان دانست، اما نتوانست تفاوتی بین جمعیت کلمه انزلی و ترکمن مشاهده نماید. نویدی مقدم فومنی (۱۳۸۴)، در بررسی تنوع ژنتیکی ۳۰ نمونه بچه ماهی آزاد دریای خزر جمعیت منطقه تنکابن با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره به وجود تنوع ژنتیکی در آنها پی برد و هتروزیگوسیتی را در هر لوکوس بین ۰/۷۵۶-۰/۴۰۶ به دست آورد. رفیعی (۱۳۸۵)، در بررسی تنوع ژنتیکی ۵۰ نمونه بچه ماهی آزاد دریای خزر از جمعیت غرب استان مازندران (تنکابن) با استفاده از روش PCR-RFLP، به وجود پلی مورفیسم در آنها پی برد و دامنه هتروزیگوسیتی را بین ۰/۸-۰/۹ و دامنه تعداد آلل را بین ۳-۶ عدد در هر لوکوس به دست آورد. لالویی و همکاران (۱۳۸۷)، در بررسی ژنتیک جمعیت تعداد ۲۶۰ نمونه ماهی کپور معمولی حوضه ی جنوبی دریای خزر (نواحی غربی، میانی و شرقی حوضه جنوبی دریای خزر، تالاب انزلی، رودخانه ی تجن، گرگانرود و خلیج گرگان) با استفاده از روش PCR-RFLP و بهره گیری از ژنهای ناحیه ی ND- 5/6 و ND- 3/4 مولکول mtDNA پرداختند و در مجموع ۱۴ و ۱۲ هاپلوتایپ متفاوت به ترتیب برای ژنهای ND- 5/6 و ND- 3/4 مشاهده کردند.

چکمه دوز (۱۳۸۸)، در مطالعه ی ساختار ژنتیک جمعیت ماهی سفید نژاد بهاره و پاییزه با استفاده از روشهای تعیین توالی DNA و ریز ماهواره به وجود تفاوت ژنتیکی بین این دو نژاد پی برد.

قریب خانی (۱۳۸۸)، در مطالعه ی ساختار ژنتیک جمعیت و فیلوژنی ۱۵۸ عدد سوف حاجی طرخان در تالاب های انزلی و امیرکلايه لاهیجان و ۲۰۷ عدد سوف سفید در سد ارس و حوضه جنوب غربی دریای خزر با استفاده از ۱۵ جفت آغازگر ریز ماهواره اعلام نمود که حداقل دو جمعیت متمایز از ماهی سوف حاجی طرخان در سه منطقه مورد بررسی و حداقل سه جمعیت متمایز از سوف سفید در چهار منطقه ی مورد بررسی وجود دارد.

رضایی و همکاران (۱۳۸۹)، در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت ۲۵ عدد ماهی سفید در سواحل استان گلستان (رودخانه های گرگانرود و قره سو) با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر ریز ماهواره در همه جایگاه های ژنی پلی مورف را مشاهده نمودند. درافشان و همکاران (۱۳۸۹)، کاربرد نشانگر ریز ماهواره را در بررسی صحت آمیخته گری بین دو گونه اقتصادی آزاد ماهیان ایران (جنس ماده قزل آلاي رنگین کمان و جنس نر ماهی آزاد دریای خزر) را مورد مطالعه قرار دادند و بیان نمودند که نتاج تولیدی آمیخته حقیقی بوده و توارث کاملی از باندهای اختصاصی والدین را دارا هستند.

عبدالحی و همکاران (۱۳۸۹)، ساختار ژنتیک جمعیت ۲۹۴ عدد ماهی سفید حوضه ی جنوبی دریای خزر (رودخانه های سفیدرود، شیرود، تجن و لمیر) را با استفاده از روش PCR- RFLP و بهره گیری از مولکول mtDNA و ۳۰ عدد ماهی سفید از هر رودخانه را با استفاده از روش ریز ماهواره مورد بررسی قرار دادند. Yousefian (2011)، تنوع ژنتیکی ماهیان آزاد جوان دریای خزر با استفاده از آغازگرهای ریز ماهواره مورد بررسی قرار داده و دامنه ی آلل مشاهده شده در هر لوکوس در والدین و فرزندان را به ترتیب ۱۳-۸ و ۱۱-۷ و دامنه آلل مؤثر در آنها را به ترتیب ۸/۸-۴/۶ و ۲/۹-۵/۲ به دست آورد. Jamshidi و Kalbassi (2011)، در بررسی ارتباط بین شکلهای مهاجر بهاره و پاییزه ۶۲ عدد ماهی آزاد دریای خزر با استفاده از ۱۶ آغازگر RAPD، ۱۷-۵ عدد آلل به ازای هر جایگاه با متوسط ۱۰/۱۲۵ به دست آوردند و میزان شباهت و فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت را به ترتیب ۰/۹۸۵۸ و ۰/۱۴۳۰ محاسبه نمودند.

Sourinejad و همکاران (2011) بررسی انتساب نسب فرزندان ۸ عدد مولد ماده و نر ماهی آزاد دریای خزر موجود در مرکز شهید باهنر کلاردشت از جمعیت رودخانه تنکابن با استفاده از ۳ جفت آغازگر ریز ماهواره را بررسی نمودند/ متوسط تعداد آلل در والدین و فرزندان را به ترتیب ۷ و ۶/۶۶، متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده در والدین و فرزندان را به ترتیب ۰/۱۹۱ ± ۰/۸۳۳ و ۰/۰۱۱ ± ۰/۷۲۳ و متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار را به ترتیب ۰/۱۳۴ ± ۰/۸۰۰ و ۰/۰۰۹ ± ۰/۶۸۴ محاسبه نمودند.

در خارج کشور Banks و همکاران (2000)، با استفاده از آنالیز داده های میکروستلایت وجود پنج زیر جمعیت مجزا را در ماهیان آزاد چینوک در ناحیه ی مرکزی کالیفرنیا نشان دادند.

Adams و همکاران (2003)، با استفاده از تکنیکهای صید، نشانه گذاری، رهاسازی و صید مجدد و ریز ماهواره به بررسی ساختار جمعیتی قزل آلای جویباری دریاچه‌های حوضه ی آبریز خلیج هند پرداختند و سطح بالایی از هتروزیگوسیتی (۰/۶-۰/۲۷) را مشاهده نمودند.

Beacham و همکاران (2004)، با استفاده از ۱۴ لوکوس ریز ماهواره ساختار جمعیت دو نوع دریاچه ای و رودخانه ای سوکی سالمون را در ۴۷ جمعیت رودخانه های شمال بریتیش کلمبیا بررسی کردند.

Yoon و همکاران (2007)، در مطالعه ی آنالیز میتوکندریایی و ریز ماهواره ای جمعیت‌های (*Oncorhynchus keta* walbaum) تنوع ژنتیکی بالاتری را در روش ریز ماهواره نسبت به روش DNA میتوکندریایی مشاهده و اعلام نمودند بهتر است در مطالعه ی ساختار جمعیتی از هر دو نشانگر استفاده گردد.

Vera و همکاران (2011)، ساختار ژنتیکی مولدین ماهی آزاد دریای خزر ایران جمع آوری شده از رودخانه های کرگانرود (۸ عدد)، ناورود (۸ عدد) و تنکابن (۶۶ عدد) و ۴۸ عدد بچه ماهی حاصل از جمعیت رودخانه ی سردآبرود را با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر ریز ماهواره و توالی یابی mtDNA مورد مطالعه قرار دادند. در روش ریز ماهواره همه ی جایگاه ها باندهای پلی مورفیک تولید نمودند و بیشترین تعداد آلل مشاهده شده (۲۳) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۹۰۲) در جایگاه *Strutta58* دیده شد.

Chauhan و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های وحشی کپورچینی (*Cirrhinus mrigala*) رودخانه های براهماپوترا، گانگوس، ایندوس، ماهانادی تفاوت ناچیزی را بین نمونه های مناطق مختلف مشاهده نمودند.

Thai و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از ۴ لوکوس ریز ماهواره ای به مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) دروینتام پرداخته و تنوع بالایی را در ماهیان وحشی نسبت به ماهیان پرورشی مشاهده کردند. همچنین Osvaldo و همکاران (۲۰۰۷) تنوع ژنتیکی و فیلوژنی این ماهی را به روش تعیین توالی DNA میتوکندری مطالعه نمودند.

انجماد اسپرم در ماهیان تکنیکی است که بدون شک در بخشهای مختلف تحقیقاتی و تولیدی بسیار کاربردی است. در این زمینه دستورالعمل‌های اختصاصی برای بعضی از ماهیان آب شیرین که عمدتاً شامل آزاد ماهیان، ماهیان خاویاری، کپور ماهیان و گربه ماهیان هستند، تهیه شده است و در دهه های اخیر نیز تحقیقات قابل ملاحظه ای در ماهیان دریایی صورت گرفته است. اخیراً بسیاری از این دستورالعملها تکمیل شده و به عنوان دانش فنی پایه جهت ایجاد پروتکل های اختصاصی برای دیگر گونه های ماهیان آب شیرین و دریایی مورد استفاده قرار گرفته است (Cabrita et al., 2008).

بیشترین تحقیقات در آزاد ماهیان در ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، قزل آلای قهوه ای (*Salmo trutta*)، قزل الای نهري (*Salvelinus fontinalis*)، و ماهی چار (*S. alpinus*) انجام شده است (Martínez-Parámo et al., 2009).

بیشترین دستورالعمل‌های تهیه شده در خصوص تکنیک انجماد اسپرم در ماهیان خاویاری مربوط به گونه های تجاری و در حال انقراض مانند فیل ماهی (*Huso huso*)، ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*)، ماهی خاویاری رنگ پریده (*Scaphirhynchus albus*)، ماهی خاویاری سبیری (*A. baeri*)، ماهی خاویاری اروپایی (*A. sturio*)، تاس ماهی روسی (*A. gueldenstaedii*) و ماهی ازون برون (*A. brevirostrum*) بوده است (Horváth et al., 2008). در گروه کپور ماهیان بیشترین تحقیقات در خصوص تکنیک‌های انجماد اسپرم بر روی گونه های کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و کپور نقره ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) صورت گرفته است (Alvarez et al., 2008). تحقیقات موفقیت آمیزی در خصوص انجماد اسپرم ماهیان پرورشی دریایی صورت گرفته است که مهمترین گونه های مورد تحقیق شامل ماهی توربوت (*Scophthalmus maximus*) (Chereguini et al., 2003) ماهی سیم دریایی سرطلایی (*Sparus aurata*) (Cabrita et al., 2005) باس دریایی اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) (Sansone et al., 2002)، مار ماهی اروپایی (*Anguilla Anguilla*) (Asturiano et al., 2003)، ماهی باس راه راه (*Morone saxatilis*) (He and Woods, 2003)، ماهی کفشک (*Hippoglossus hippoglossus*) (Babiak et al., 2006)، ماهی گروپر سیاه (*Epinephelus marginatus*)، گروپر مالابا (*E. malabaricus*) (Cabrita et al., 2009) و ماهیان روغنی کاد (*Gadus morhua*) (Rideout et al., 2004) میباشند.

طی سالهای گذشته تعدادی از رودخانه های مهم و شیلای حوضه جنوبی دریای خزر بصورت محدود و پراکنده، با اهداف مختلف اعم از هیدرولوژی و هیدروبیولوژی و بیولوژی برخی گونه های ماهیان این حوضه مورد مطالعه قرار گرفته اند (عبدلی، ۱۳۷۳: روشن طبری، ۱۳۷۳). نتایج مطالعات نشان می دهد که تخریب رودخانه ها در سال های اخیر شدت پیدا نموده و بقا بسیاری از گونه ها بدون حمایت از آنها امکان پذیر نیست. بدیهی است جهت بهره برداری پایدار، شناخت و احیاء رودخانه های این منطقه امری ضروری بوده و برای هر نوع تصمیم گیری در ارتباط با احیاء مناطق تکثیر طبیعی، نیاز به اطلاعات دقیق می باشد. در این راستا لازم است که بررسی ها بصورت هدفمند و بمنظور احیاء رودخانه ها بخصوص رودخانه تجن و شرایط اکولوژیک سد شهید رجایی جهت معرفی برخی از گونه های در معرض خطر صورت گیرد.

رودخانه های تجن، هراز، سردابرو و چالوس به لحاظ تنوع گونه های ماهی و شرایط زیستگاهی، مهمترین رودخانه های این حوضه در استان مازندران می باشد.

۳-۱- اهداف

- شناسایی ساختار ژنتیکی جمعتهای احتمالی گونه های سس، سوف، کلمه، سفید و ماهی آزاد دریای
- ایجاد بانک DNA از ماهیان سس، سوف، کلمه، سفید و آزاد دریای خزر
- تشکیل بانک ژن ماهیان در معرض خطر دریای خزر
- بررسی امکان احیای رودخانه ها بمنظور تکثیر طبیعی ماهیان
- بررسی امکان تکثیر طبیعی ماهیان در معرض خطر انقراض در رودخانه های مورد مطالعه.

۲- مواد و روش کار

۲-۱- نمونه برداری و استخراج DNA

ماهی سفید: نمونه برداری از ماهی سفید با استفاده از تور پره (دریا) و صید با دام گوشگیر (رودخانه ها) از نواحی غربی (سواحل استان گیلان)، میانی (سواحل استان مازندران) و شرقی (سواحل استان گلستان) حوضه جنوبی دریای خزر جمع آوری گردیده است. تعداد کل نمونه ها ۲۴۰ عدد بوده که از دریا ۱۲۰ نمونه (مازندران، گیلان و گلستان) و رودخانه های سفیدرود، تجن و گرگانرود هر رودخانه ۴۰ نمونه جمع آوری گردید.

ماهی کلمه: نمونه برداری از ماهی کلمه با استفاده از تور پره (دریا) از سواحل گیلان (محدوده انزلی)، سواحل مازندران (محدوده امیر آباد)، سواحل گلستان (محدوده گمیشان) و خلیج گرگان جمع آوری گردیده است. تعداد کل نمونه ها ۱۶۰ عدد بوده که از سواحل هر استان ۴۰ نمونه و خلیج گرگان نیز ۴۰ نمونه جمع آوری گردید.

ماهی آزاد: نمونه برداری از ماهی آزاد با استفاده از سد شیل و تورهای سالیك و دام از رودخانه های چالوس، سردآبرود، چشمه کیله، کرگانرود و آستارا (از هر رودخانه ۱۵ نمونه) در فصول پاییز و زمستان، جمع آوری گردید.

سس ماهی: نمونه برداری از سس ماهی با استفاده از دستگاه الکتروشوکرو دام از رودخانه های تجن و سفیدرود انجام و از هر رودخانه ۸ نمونه جمع آوری گردید. همچنین از طریق تور پره شرکت های تعاونی صیادی نیز ۳۰ نمونه از دریا (استان مازندران منطقه نوشهر و چالوس ۱۵ نمونه و استان گیلان منطقه انزلی ۱۵ نمونه) صید شد.

ماهی سوف: نمونه برداری از ماهی سوف با استفاده از تور پره (دریا) از نواحی غربی (سواحل استان گیلان)، میانی (سواحل استان مازندران) و شرقی (سواحل استان گلستان) حوضه جنوبی دریای خزر جمع آوری گردیده است. تعداد کل نمونه ها ۹۰ عدد بوده که از هر منطقه ۳۰ نمونه جمع آوری گردید. سپس استخراج DNA و واکنش PCR انجام شد (جزئیات در گزارش پروژه ذکر شده است).

۲-۲- نمونه برداری و انجام انجماد اسپرم

ماهی آزاد: محل انجام آزمایش مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت بود. تعداد ۲۴ عدد ماهی آزاد مولد نر منتقل شده به مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی کلاردشت (مولدین وحشی تازه صید شده) انتخاب و مورد ارزیابی اولیه و بررسی آمادگی جهت اسپرم دهی قرار گرفته و ۱۱ ماهی نر جهت نمونه برداری انتخاب شدند. پس از بیومتری و اسپرم گیری، ارزیابی درصد تحرک نمونه اسپرم، مدت زمان تحرک و تعیین تراکم انجام شد. (Tuset et al. 2008). نمونه اسپرم به نسبت ۳:۱ (رقیق کننده: اسپرم) با محلول رقیق کننده (0.3M Glucose, 10% Methanol and 10% egg yolk) مخلوط گردید. سپس به نی های انجماد ۰/۵ میلی لیتری منتقل شدند (Ninhaus-Silveria et al., 2006). پس از هم دمایی نمونه ها اقدام به انجماد به روش دستی و با

رعایت فاصله ۲ سانتی متر از سطح ازت مایع به مدت ۱۰ دقیقه گردید. در نهایت نمونه های منجمد شده در ازت مایع (۱۹۶- درجه سانتی گراد) قرار گرفتند. انجماد زدایی نمونه ها جهت بررسی های بعدی در حمام آب با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. برای تحریک فعالیت اسپرمها از محلول ۰.۳% NaCl استفاده گردید (Sarvi et al., 2006).

ماهی سفید: مکان نمونه برداری رودخانه شیرود یکی از مهمترین رودخانه های غرب مازندران جهت صید مولدین ماهی سفید در شهرستان تنکابن واقع است. جهت انتخاب مولدین نر تعداد ۵۶ عدد ماهی سفید نر از رودخانه های شیرود و تنکابن تهیه گردید. ماهیان مورد ارزیابی اولیه قرار گرفتند و پس از بررسی آمادگی جهت اسپرم دهی، ۳۲ ماهی نر جهت نمونه برداری انتخاب شدند. نمونه های استحصال شده تا زمان بررسی های کمی و کیفی (شمارش سلولی، بررسی درصد تحرک، شدت تحرک و pH) در دمای ۱-۳ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. ارزیابی درصد تحرک نمونه اسپرم، تعیین تراکم، مدت زمان تحرک، اندازه گیری فشار اسمزی مایع سمینال انجام شد (Yavas and Bozkurt, 2011; Tuset et al, 2008).

جهت انجام انجماد اسپرم ابتدا دمای نمونه اسپرم و ماده رقیق کننده تا دمای ۴ درجه سانتیگراد پایین آورده شد. هر نمونه اسپرم به نسبت ۳:۱ (رقیق کننده: اسپرم) با دو محلول رقیق کننده مخلوط گردید. نمونه ها سپس به نی های انجماد ۰/۵ میلی لیتری منتقل شدند. پس از هم دمایی نمونه ها اقدام به انجماد در دستگاه Planer Kryo گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده و در نهایت داخل ازت مایع (۱۹۶- درجه سانتی گراد) قرار گرفتند. نمونه ها جهت بررسی های بعدی در حمام آب با دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه قرار گرفت. برای تحریک فعالیت اسپرمها از محلول ۰.۳% NaCl استفاده گردید (Yavas and Bozkurt, 2011; Rani and Munuswamy 2014). (جزئیات بیشتر در گزارش پروژه آمده است).

آنالیز آماری: داده های بدست آمده از درصد تحرک و مدت زمان تحرک سلولهای اسپرم در نرم افزار SPSS وارد و برای آنالیز داده ها از آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و برای مقایسه میانگین ها از تست Duncan استفاده شده و در نهایت داده ها بصورت انحراف معیار \pm میانگین گزارش شد (Zar, 1994).

۳-۲ - منطقه مورد مطالعه و موقعیت ایستگاه های رودخانه ها

نمونه برداری از پارامترهای زیستی و غیر زیستی بصورت فصلی، در ایستگاه های تعیین شده در رودخانه های مورد مطالعه صورت گرفت (جزئیات بتفصیل در پروژه مربوطه ذکر شده است).

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده های بدست آمده با نرم افزار آماری Systat و با استفاده از آنالیز واریانس دوطرفه (Two way ANOVA) بعد از نرمال سازی داده ها با روش کولموگروف-اسمیرنوف انجام شد. برای مقایسه میانگین ها از آزمون دانکن (Duncan) در سطح ۵ درصد ($P=0.05$) استفاده و محاسبه داده ها و ترسیم نمودارها با بسته های نرم افزاری EXCEL انجام شد (Conover, 1980).

۳- نتایج

۳-۱- بانک ژن

۳-۱-۱- ماهی سفید

استخراج DNA به روش استات سدیم در تمامی نمونه‌های ماهی سفید انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به دو روش استفاده از ژل آگارز ۱٪ و دستگاه بیوفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن به شرح ذیل می‌باشد.

بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (یک درصد) و مشاهده تیزی و شدت باندهای تولید شده نشان داد که DNA استخراج شده از باله ماهی سفید از کیفیت و کمیت مناسبی برای استفاده در آزمایش‌های PCR برخوردار می‌باشد. نتایج نشان داده که از مجموع از ۱۰ جایگاه ریزماهواره بررسی شده در ماهی سفید، ۹ جایگاه پلی‌مورف و یک جایگاه مونومورف (*SYP5*) بوده است

آللهای واقعی و موثر

همانگونه که جدول ۱-۳-۱ نشان می‌دهد، بیشترین تعداد آلل واقعی در جایگاه *SYP4* مربوط به نمونه‌های مازندران، گیلان و گرگانرود (۱۵ آلل) بوده و کمترین آن در جایگاههای *SYP6* و *LOC4* (۳ آلل) می‌باشد. بیشترین تعداد الل موثر (۱۱/۶۸ الل) در جایگاه *SYP4* در نمونه‌های مازندران و کمترین مقدار آن در جایگاه *SYP6* مربوط به نمونه‌های گرگانرود (۱/۴۳ الل) بوده است. بیشترین میانگین تعداد آلل‌های واقعی (۷/۸۲) در بین نمونه‌های گیلان و کمترین آن (۷/۲۲) در تجن مشاهده شده است. ضمن اینکه بیشترین آلل موثر (۴/۵۲) در نمونه‌های گیلان و کمترین آن (۴/۲۶) در سفیدرود بود. قابل ذکر است که میانگین تعداد آلل‌های واقعی و موثر در بین تمامی نمونه‌ها بترتیب $7/26 \pm 0/49$ و $4/37 \pm 0/35$ بوده است.

جدول ۱-۳-۱ تعداد الل واقعی (NA) و موثر (NE) جایگاه‌های بررسی شده در ماهی سفید

جایگاه	گلستان		مازندران		گیلان		سفیدرود		تجن		گرگانرود	
	N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A
CA1,2	۷	۳/۸۸	۷	۳/۸۸	۷	۳/۴۳	۵	۲/۷۵	۵	۳/۵۰	۶	۳/۶۸
CA3,4	۱۱	۷/۰۲	۱۰	۵/۴۳	۱۱	۶/۵۳	۹	۶/۸۸	۱۱	۷/۶۷	۹	۵/۶۵
CA5,6	۶	۴/۴۳	۶	۴/۸۶	۸	۴/۱۸	۸	۵/۱۵	۸	۵/۲۸	۷	۴/۴۴
CA7,8	۵	۲/۸۱	۵	۲/۶۳	۵	۲/۶۱	۶	۳/۱۵	۶	۲/۵۸	۵	۲/۷۲
Syp2	۹	۳/۷۵	۱۰	۳/۴۳	۱۲	۴/۹۵	۱۳	۴/۳۹	۱۰	۳/۰۹	۱۰	۴/۶۴
Syp4	۱۴	۱۰/۳۹	۱۵	۱۱/۶۸	۱۵	۱۰/۱۹	۱۳	۸/۵۳	۱۳	۹/۰۴	۱۵	۱۱/۳۹
Syp6	۳	۱/۳۳	۳	۱/۴۰	۳	۱/۳۶	۳	۱/۴۴	۳	۱/۲۶	۳	۱/۴۳
LOC4	۳	۱/۸۷	۳	۲/۵۴	۵	۳/۱۲	۵	۲/۹۷	۴	۲/۶۳	۴	۲/۳۵
MFW2	۴	۳/۳۴	۵	۴/۱۱	۵	۴/۳۴	۵	۳/۱۱	۵	۳/۶۳	۴	۳/۲۹

گرگانرود		تجن		سفیدرود		گیلان		مازندران		گلستان		جایگاه
N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A	
۴/۳۷	۷/۲۶	۱/۱۵	۷/۲۲	۴/۲۶	۷/۴۴	۴/۵۲	۷/۸۹	۴/۴۴	۷/۱۱	۴/۳۱	۶/۸۸	میانگین
۰/۹۷	۱/۲۷	۰/۸۵	۱/۱۵	۰/۷۵	۱/۲۰	۰/۸۶	۱/۳۳	۰/۹۹	۱/۳۱	۰/۹۳	۱/۲۶	SE

تنوع ژنتیکی

همانگونه که جدول ۱-۳-۲ نشان می دهد، بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۹۲) در جایگاه $CAI,2$ مربوط به نمونه های گیلان بوده و کمترین آن در جایگاه $SYP6$ (۰/۲۲) بوده است. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۹۱) در جایگاه $SYP4$ و در نمونه های مازندران و گرگانرود و کمترین مقدار آن در جایگاه $SYP6$ مربوط به نمونه های تجن (۰/۲۰) بوده است. بیشترین میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۵۹) در بین نمونه های گیلان و کمترین آن (۰/۵۲) در تجن و گرگانرود مشاهده شده است. ضمن اینکه بیشترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۷۵) در نمونه های مازندران و کمترین آن (۰/۶۷) در سفیدرود بود. قابل ذکر است که میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بین تمامی نمونه ها بترتیب 0.55 ± 0.03 و 0.69 ± 0.02 بوده است. محاسبه ضرایب افت هتروزیگوسیتی نشان می دهد که در اکثر مناطق نمونه برداری و در تمامی جایگاهها (به غیر از $CAI,2$) کاهش هتروزیگوسیتی یا به عبارت دیگر بیشتر بودن مقادیر H_E نسبت به H_O وجود دارد.

جدول ۱-۳-۲ مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_O) و مورد انتظار (H_E) برای جایگاه های مورد بررسی در ماهی سفید

گرگانرود		تجن		سفیدرود		گیلان		مازندران		گلستان		جایگاه
H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	
0/72	0/70	0/71	1/00	0/63	1/00	0/70	0/92	0/74	0/77	0/74	0/82	$CAI,2$
0/82	0/42	0/87	0/47	0/85	0/25	0/84	0/45	0/81	0/35	0/85	0/37	$CA3,4$
0/77	0/65	0/81	0/37	0/80	0/52	0/76	0/65	0/79	0/52	0/77	0/37	$CA5,6$
0/63	0/45	0/61	0/32	0/68	0/50	0/61	0/32	0/62	0/35	0/64	0/47	$CA7,8$
0/78	0/52	0/67	0/52	0/77	0/65	0/79	0/62	0/70	0/55	0/73	0/42	$Syp2$
0/91	0/77	0/88	0/55	0/88	0/47	0/90	0/75	0/91	0/80	0/90	0/62	$Syp4$
0/30	0/35	0/20	0/22	0/30	0/35	0/26	0/30	0/28	0/32	0/24	0/27	$Syp6$
0/57	0/25	0/62	0/60	0/66	0/47	0/67	0/52	0/60	0/55	0/46	0/45	$LOC4$
0/69	0/90	0/72	0/60	0/67	0/55	0/77	0/77	0/75	0/77	0/70	0/92	$MFW2$
۰/۶۸	۰/۵۲	۰/۶۸	۰/۵۲	۰/۶۹	۰/۵۳	۰/۷۰	۰/۵۹	۰/۶۹	۰/۵۶	۰/۶۷	۰/۵۳	میانگین
۰/۰۷	۰/۰۷	۰/۰۷	۰/۰۷	۰/۰۶	۰/۰۷	۰/۰۶	۰/۰۷	۰/۰۶	۰/۰۶	۰/۰۷	۰/۰۷	SE

تعادل هاردی - واینبرگ

به منظور بررسی تعادل هاردی واینبرگ در تمامی مناطق مورد بررسی وجایگاههای مختلف از آزمون χ^2 استفاده شد. نتایج نشان داد که کلیه نمونه ها به جز نمونه های گلستان و تجن در جایگاه $LOC4$ و نمونه های

منطقه گیلان در جایگاه $MFW2$ انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ ($P<0/05$)، ($P<0/001$) را نشان دادند (جدول ۱-۳-۳).

جدول ۱-۳-۳ بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در مناطق مختلف نمونه برداری ماهی سفید

منطقه	CA1,2	CA3,4	CA5,6	CA7,8	SYP2	SYP4	SYP6	LOC4	MFW2
گلستان	χ^2	۶۱/۳۵	۱۸۵/۳۶	۱۰۹/۷۱	۳۱/۴۷	۱۳۸/۳۳	۱۷۸/۹۷	۱/۰۲	۲۵/۸۴
	/Pro	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۴۰	۰/۰۰
	Sig,	***	***	***	***	***	***	ns	***
مازندران	χ^2	۴۷/۱۱	۱۷۱/۶۳	۹۰/۶۷	۶۲/۷۷	۱۲۵/۳۵	۱۹۷/۱۸	۱/۵۱	۳۰/۹۷
	/Pro	۰/۰۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۶۸	۰/۰۰۱
	Sig,	***	***	***	***	***	***	ns	***
گیلان	χ^2	۴۹/۴۷	۱۶۰/۸۸	۷۱/۴۱	۵۲/۸۵	۱۳۹/۲۰	۲۱۲/۸۳	۱/۲۵	۱۱/۲۹
	/Pro	۰/۰۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۷۴	۰/۳۳
	Sig,	***	***	***	***	***	***	ns	ns
سفیدرود	χ^2	۴۰/۰۰	۱۸۹/۴۵	۶۰/۰۴	۷۸/۵۷	۱۸۲/۶۳	۱۹۲/۲۲	۱/۸۰	۵۹/۵۸
	/Pro	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۶۱	۰/۰۰
	Sig,	***	***	***	***	***	***	ns	***
گرگان	χ^2	۱۰۶/۵۵	۱۸۱/۰۲	۱۱۷/۰۹	۴۱/۹۰	۱۶۲/۷۱	۱۸۶/۵۰	۰/۶۴	۳۲/۷۷
	/Pro	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۲۶	۰/۰۰
	Sig,	***	***	***	***	***	***	ns	***
گرگانرود	χ^2	۴۶/۶۹	۱۱۶/۵۴	۹۲/۱۴	۶۴/۳۹	۱۶۸/۰۹	۲۰۲/۷۳	۱/۸۰	۱۴/۸۰
	/Pro	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۶۱	۰/۰۲
	Sig,	***	***	***	***	***	***	ns	*

ns=not significant, * $P<0/05$, ** $P<0/01$, *** $P<0/001$

فاصله و شباهت ژنتیکی، تمایز ژنتیکی (F_{ST})

ماتریس فواصل و شباهت ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی Nei (1972) محاسبه شده و در جدول ۱-۳-۴ آمده است. همانطوریکه در جدول ملاحظه می‌شود بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۱۰) بین گرگانرود و سفیدرود می‌باشد. همچنین کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۲) بین نمونه‌های گرگانرود و مازندران مشاهده شده است. بیشترین و کمترین شباهت ژنتیکی دقیقاً برعکس فاصله ژنتیکی می‌باشد.

جدول ۱-۳-۴ ماتریس فاصله و شباهت ژنتیکی برحسب مناطق مختلف نمونه برداری ماهی سفید (اعداد بالای قطر مربوط به شباهت ژنتیکی و پائین قطر مربوط به فاصله ژنتیکی می باشد)

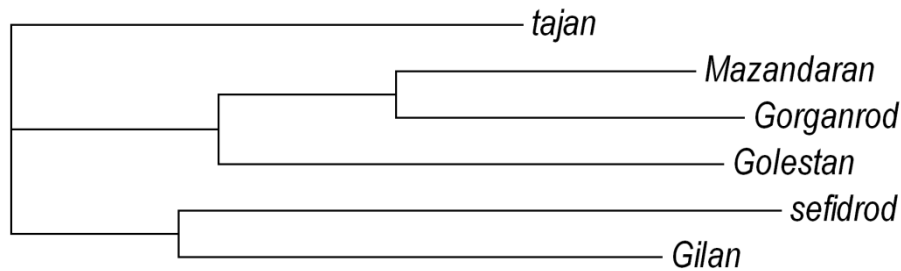
گلستان	مازندران	گیلان	سفیدرود	تجن	گرگانرود
0/00	0/96	0/93	0/91	0/95	0/97
0/04	0/00	0/96	0/91	0/95	0/99
0/07	0/05	0/00	0/96	0/94	0/95
0/09	0/09	0/04	0/00	0/94	0/91
0/05	0/05	0/06	0/06	0/00	0/93
0/03	0/02	0/05	0/10	0/07	0/00

بطور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی از فاکتور F_{ST} استفاده می گردد. نتایج بدست آمده از F_{ST} نشان می دهد که حداکثر آن (۰/۰۲) بین نمونه های گرگانرود با سفیدرود و تجن که دارای کمترین میزان جریان ژنی (۳/۷) است مشاهده می شود. حداقل F_{ST} (۰/۰۰۱) بین نمونه های گرگانرود با گلستان و مازندران که دارای بیشترین میزان جریان ژنی (۳۴/۶۰) است، مشاهده شده است (جدول ۱-۳-۵). بر اساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه های گلستان با گیلان، گلستان با سفیدرود، گلستان با تجن، مازندران با سفیدرود و گیلان با تجن معنی دار بود ($P < ۰/۰۵$). علاوه بر این طبق محاسبات انجام شده اختلاف بین افراد هر منطقه ۲۲ درصد، داخل افراد ۷۷ درصد و بین جمعیت ها ۱ درصد بوده است.

جدول ۱-۳-۵ میزان F_{ST} محاسبه شده برای نواحی مختلف نمونه برداری ماهی سفید (اعداد پائین ماتریکس میزان F_{ST} بر اساس تست AMOVA و اعداد بالا مقادیر احتمال بر اساس ۹۹ بار تکرار)

گلستان	مازندران	گیلان	سفیدرود	تجن	گرگانرود
0/00	0/12	0/01	0/01	0/04	0/36
۰۴۰/۰	0/00	0/13	0/01	0/05	0/47
۱۷۰/۰	۰۴۰/۰	0/00	0/11	0/03	0/09
۲۳۰/۰	۲۲۰/۰	۰۰۳۰/	0/00	0/02	0/01
۰۶۰/۰	۰۸۰/۰	۰۰/۰۱	۰۰۹۰/	0/00	0/01
۰۱۰/۰	۱۰۰/۰	۰۰۵۰/	۰۲۴۰/	۰۱۶۰/	0/00

علاوه بر آنالیزهای آماری انجام شده، نمودارهای شجره ای نمونه های ماهی سفید در ۶ منطقه مورد بررسی بر اساس فاصله ژنتیکی Nei و به روش Neighbor-joining رسم شد (شکل ۱-۳-۱). بر طبق دندروگرام فاصله ژنتیکی حاصل از تمام معیارهای بکار رفته نمونه های جمع آوری شده ماهی سفید از مناطق مختلف، به سه شاخه تقسیم شدند، شاخه اول نمونه های رودخانه تجن، شاخه دوم شامل نمونه های مازندران، گلستان و گرگانرود و شاخه سوم نمونه های گیلان و سفیدرود در آن جای گرفته است.



شکل ۱-۳-۱ نمودار شجره ای نمونه های ماهی سفید که بر اساس روش N.J. رسم شده است.

۲-۱-۳- ماهی کلمه

بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (یک درصد) و مشاهده تیزی و شدت باندهای تولید شده نشان داد که DNA استخراج شده از باله ماهی کلمه از کیفیت و کمیت مناسبی برای استفاده در آزمایش‌های PCR برخوردار می‌باشد. همچنین تمامی ۷ جایگاه ریزماهواره بررسی شده در ماهی کلمه، پلی‌مورف بوده که جزئیات آن در جدول ۳-۶ آورده شده است. همانگونه که جدول نشان می‌دهد بیشترین تعداد آلل در جایگاه SYP4 و کمترین آلل در جایگاه SYP5 می‌باشد.

جدول ۱-۳-۶ خصوصیات و نتایج بدست آمده از بررسی جایگاههای ریزماهواره در ماهی کلمه

جایگاه	دمای اتصال °C	تعداد چرخه	محداده آللی (pb)	تعداد آلل
CA1,2	۵۱	۳۰	۱۱۲-۱۳۲	۶
CA3,4	۶۰	۳۰	۲۰۸-۲۷۲	۹
CA5,6	۵۵	۳۰	۱۴۸-۱۷۲	۷
CA7,8	۵۷	۳۰	۱۲۸-۱۶۰	۸
LCO3	۵۸	۳۰	۲۵۶-۲۸۴	۶
LCO5	57	۳۰	۱۰۴-۱۲۸	۶
MFW2	۶۰	۳۰	۲۰۸-۲۲۴	۵

آلل‌های واقعی و موثر

همانگونه که جدول ۱-۳-۷ نشان می‌دهد، بیشترین تعداد آلل واقعی در جایگاه CA3,4 مربوط به نمونه های مازندران، گیلان، گرگانرود و خلیج گرگان (۹ آلل) بوده و کمترین آن در جایگاه CA7,8 (۴ آلل) می‌باشد. بیشترین تعداد آلل موثر (۷/۵۸ آلل) در جایگاه CA3,4 در نمونه های خلیج گرگان و کمترین مقدار آن در جایگاه MFW2 مربوط به نمونه های مازندران (۲/۷۸ آلل) بوده است. بیشترین میانگین تعداد آلل های واقعی (۶/۱۴) در نمونه های گیلان و کمترین آن (۵/۲۹) در مازندران مشاهده شده است. ضمن اینکه بیشترین آلل موثر (۴/۸۷)

در نمونه های گلستان و کمترین آن (۴/۱۳) در مازندران بود. قابل ذکر است که میانگین تعداد آلل های واقعی و موثر در بین تمامی نمونه ها بترتیب $۵/۷۵ \pm ۰/۳۰$ و $۴/۷۶ \pm ۰/۲۵$ بوده است.

جدول ۱-۳-۷ تعداد آلل واقعی (N_A) و موثر (N_E) جایگاه های بررسی شده در ماهی کلمه

جایگاه		گیلان		مازندران		گلستان		خلیج گرگان	
		N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A
CA1,2		5/00	4/20	5/00	4/32	6/00	4/74	6/00	5/76
CA3,4		9/00	7/69	9/00	6/35	9/00	7/37	9/00	7/58
CA5,6		6/00	3/58	6/00	4/85	6/00	4/97	6/00	4/85
CA7,8		8/00	6/81	4/00	3/67	4/00	3/99	4/00	3/91
LCo3		5/00	3/79	4/00	3/14	5/00	4/18	6/00	5/13
LOC5		5/00	4/23	4/00	3/84	5/00	4/22	5/00	4/77
MFW2		5/00	3/29	5/00	2/78	5/00	4/62	5/00	4/77
میانگین		۶/۱۴	۴/۸۰	۵/۲۹	۴/۱۳	۵/۷۱	۴/۸۷	۵/۸۶	۵/۲۵
SE		۰/۶۳	۰/۶۵	۰/۶۸	۰/۴۵	۰/۶۱	۰/۴۴	۰/۵۹	۰/۴۴

تنوع ژنتیکی

همانگونه که جدول ۱-۳-۸ نشان می دهد، بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۶۷) در جایگاه CA3,4 در نمونه های گیلان و خلیج گرگان و کمترین آن در جایگاه MEF2 (۰/۴۴) در مازندران بوده است. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۸۲) در جایگاه CA3,4 در نمونه های خلیج گرگان و کمترین مقدار آن در جایگاه MFW2 مربوط به نمونه های مازندران (۰/۵۰) بوده است. بیشترین میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۶۰) در بین نمونه های خلیج گرگان و کمترین آن (۰/۵۴) در مازندران مشاهده شده است. ضمن اینکه بیشترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۷۴) در نمونه های خلیج گرگان و کمترین آن (۰/۷۲) در مازندران بود. قابل ذکر است که میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بین تمامی نمونه ها بترتیب $۰/۷۳ \pm ۰/۰۱$ و $۰/۵۸ \pm ۰/۱۸$ بوده است. محاسبه ضرایب افت هتروزیگوسیتی نشان می دهد که در اکثر مناطق نمونه برداری و در تمامی جایگاهها کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار وجود دارد.

جدول ۱-۳-۸ مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_O) و مورد انتظار (H_E) برای جایگاه های مورد

بررسی در ماهی کلمه

جایگاه		گیلان		مازندران		گلستان		خلیج گرگان	
		H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O
CA1,2		۷۵۰/	۶۵۰/	۵۷۰/	۰/۷۸	۵۹۰/	۰/۷۷	۶۳۰/	۰/۷۹
CA3,4		۷۶۰/	۰/۸۰	۶۴۰/	۰/۸۰	۶۶۰/	۰/۸۱	۶۷۰/	۰/۸۲
CA5,6		۷۳۰/	۲۵۰/	۵۹۰/	۰/۷۹	۶۰۰/	۰/۷۹	۵۹۰/	۷۵۰/
CA7,8		۶۵۰/	۰/۸۱	۵۳۰/	۰/۷۵	۵۵۰/	۰/۷۱	۵۴۰/	۰/۷۵
LCo3		۵۴۰/	۶۳۰/	۴۸۰/	۵۵۰/	۵۶۰/	۵۰۰/	۶۱۰/	۵۸۰/

خلیج گرگان		گلستان		مازندران		گیلان		جایگاه
H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	
۷۳۰/	۵۹۰/	۷۸۰/	۵۶۰/	۷۸۰/	۵۴۰/	۷۸۰/	۵۶۰/	LOC5
۷۳۰/	۵۹۰/	۷۰۰/	۵۸۰/	۵۰۰/	۴۴۰/	۶۳۰/	۵۰۰/	MFW2
۰/۷۴	۰/۶۰	۰/۷۴	۰/۵۷	۰/۷۲	۰/۵۴	۰/۷۳	۰/۵۷	میانگین
۰/۰۳	۰/۰۱	۰/۰۴	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۲	SE

تبادل هاردی - واینبرگ

به منظور بررسی تبادل هاردی واینبرگ در تمامی مناطق مورد بررسی و جایگاه‌های مختلف از آزمون χ^2 استفاده شد. نتایج نشان داد که کلیه نمونه‌ها به جز نمونه‌های گلستان در جایگاه LOC3 انحراف از تبادل هاردی- واینبرگ ($P < 0.05$) را نشان دادند (جدول ۱-۳-۹).

جدول ۱-۳-۹ بررسی تبادل هاردی- واینبرگ در مناطق مختلف نمونه برداری ماهی سفید

منطقه	CA1,2	CA3,4	CA5,6	CA7,8	LOC3	LOC5	MFW2
گیلان	χ^2	۷۴/۴۱	۲۸۰/۰۰	۱۶۰/۰۰	۲۰۰/۰۰	۵۷/۳۳	۷۱/۵۰
	/Pro	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
	Sig,	***	***	***	***	***	***
مازندران	χ^2	۹۳/۶۳	۲۵۱/۷۸	۱۲۰/۰۰	۱۲۰/۰۰	۴۷/۵۰	۱۵/۸۴
	/Pro	۰/۰۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰۱
	Sig,	***	***	***	***	***	***
گلستان	χ^2	۱۱۲/۰۰	۲۴۶/۸۳	۱۲۰/۰۰	۱۲۰/۰۰	۳/۸۳	۸۹/۷۲
	/Pro	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۱۱	۰/۰۳
	Sig,	***	***	***	***	ns	*
خلیج گرگان	χ^2	۱۴۸/۸۰	۲۴۹/۵۱	۱۰۴/۲۰	۱۲۰/۰۰	۵۷/۰۲	۲۴/۶۸
	/Pro	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۲
	Sig,	***	***	***	***	***	*

ns=not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

فاصله و شباهت ژنتیکی ، تمایز ژنتیکی (F_{ST})

ماتریس فواصل و شباهت ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی (Nei (1972) محاسبه شده و در جدول ۱-۳-۳ آمده است. همانطوریکه در جدول ملاحظه می‌شود بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۲۱) بین نمونه‌های خلیج گرگان و گیلان می‌باشد. همچنین کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۴) بین نمونه‌های گلستان و خلیج گرگان مشاهده شده است. بیشترین و کمترین شباهت ژنتیکی دقیقاً برعکس فاصله ژنتیکی می‌باشد.

جدول ۱-۳-۱۰ ماتریس فاصله و شباهت ژنتیکی برحسب مناطق مختلف نمونه برداری ماهی کلمه (اعداد بالای قطر مربوط به شباهت ژنتیکی و پائین قطر مربوط به فاصله ژنتیکی می باشد)

گیلان	مازندران	گلستان	خلیج گرگان
0/00	۰/۸۸	۰/۸۷	۰/۸۱
۰/۵۰	0/00		۰/۸۹
۰/۶۰	0/05	0/00	۰/۹۵
۲۱۰/	۱۲۰/	0/04	0/00

بطور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی از فاکتور F_{ST} استفاده می گردد. نتایج بدست آمده از F_{ST} نشان می دهد که حداکثر آن (۰/۰۴) بین نمونه های گیلان با خلیج گرگان که دارای کمترین میزان جریان ژنی (۹/۶) است، مشاهده می شود. حداقل F_{ST} (۰/۰۰۱) بین نمونه های خلیج گرگان با گلستان که دارای بیشترین میزان جریان ژنی (۴۳/۶۳) است، مشاهده شده است (جدول ۱-۳-۱۱ و ۱-۳-۱۲). بر اساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه های گلستان با گیلان، گیلان با مازندران، گیلان با خلیج گرگان معنی دار بود ($P < ۰/۰۵$).

جدول ۱-۳-۱۱ میزان F_{ST} محاسبه شده برای نواحی مختلف نمونه برداری ماهی کلمه (اعداد پائین ماتریکس میزان F_{ST} بر اساس تست AMOVA و اعداد بالا مقادیر احتمال بر اساس ۹۹ بار تکرار)

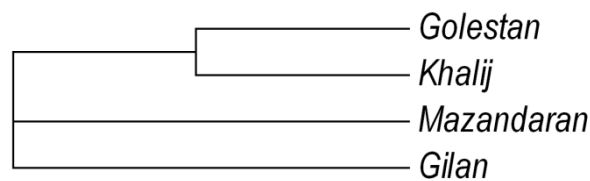
گیلان	مازندران	گلستان	خلیج گرگان
0/00	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱
۰/۰۲۸	0/00	۰/۰۸	۰/۰۵
۰/۰۲۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰	۰/۳۷
۰/۰۳۹	۰/۰۲۵	۰/۰۰۱	0/00

جدول ۱-۳-۱۲ میزان Nm محاسبه شده برای نواحی مختلف نمونه برداری ماهی کلمه

گیلان	مازندران	گلستان	خلیج گرگان
0/00	13/66	13/69	9/61
	0/00	28/84	13/68
		0/00	43/63
			0/00

علاوه بر آنالیزهای آماری انجام شده، نمودارهای شجره ای نمونه های ماهی سفید در ۴ منطقه مورد بررسی بر اساس فاصله ژنتیکی Nei و به روش Neighbor-joining رسم شد (شکل ۱-۳-۲). بر طبق دندروگرام فاصله ژنتیکی حاصل از تمام معیارهای بکار رفته نمونه های جمع آوری شده ماهی کلمه از مناطق مختلف، به سه شاخه تقسیم

شدند، شاخه اول نمونه های گلستان و خلیج گرگان، شاخه دوم شامل نمونه های مازندران و شاخه سوم نمونه های گیلان در آن جای گرفته است.



شکل ۱-۳-۲ نمودار شجره ای نمونه های ماهی کلمه که بر اساس روش N.J. رسم شده است

۳-۱-۳-۳- ماهی آزاد

بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (یک درصد) نشان داد که DNA استخراج شده از باله ماهی آزاد از کیفیت و کمیت مناسبی برای استفاده در آزمایش های PCR برخوردار می باشد. طول قطعه تکثیر شده در تمامی نمونه ها ۶۵۰ جفت باز بود. توالی قطعه D-loop نمونه های ماهی آزاد، با استفاده از برنامه BioEdit همتراز شدند. از مجموع ۶۵۰ جفت نوکلئوتید همتراز شده، بطور میانگین تعداد ۲۶۰ جایگاه متغیر در توالی های مختلف شناسائی شد. همچنین در بین نمونه های جمع آوری شده، ۴۵ هاپلوتیپ مشاهده گردید که بیشترین تعداد در رودخانه چالوس (۱۳ هاپلوتیپ) و کمترین هاپلوتیپ در رودخانه آستارا (۹ هاپلوتیپ) بود. در بین هاپلوتیپ های مشاهده شده، هاپلوتیپ شماره ۵ مشترک بین نمونه های رودخانه های چالوس و سردابرو، هاپلوتیپ ۱۵ مشترک بین رودخانه های سردابرو و آستارا، هاپلوتیپ های ۳۵، ۳۷، ۴۰ و ۴۲ مشترک بین رودخانه های تنکابن و سردابرو و هاپلوتیپ های ۴۱، ۴۳، ۴۴ و ۴۵ مشترک بین رودخانه های آستارا، کرگانرود و سردابرو بود.

ترکیب نوکلئوتیدها در هر یک از مناطق نمونه برداری در جدول ۱-۳-۱۳ نشان داده شده است. حداکثر احتمال ترکیبی الگوی نوکلئوتیدی و میزان احتمال جانشینی نوکلئوتیدی هر باز بر اساس روش Kumar و همکاران (۲۰۰۸) در جدول ۳-۱۴ محاسبه شده است. طبق محاسبات انجام شده درصد ترکیب بازهای نوکلئوتیدی در مجموع نمونه ها برای A، T، C و G بترتیب ۰/۳۴، ۰/۲۹، ۰/۲۶ و ۰/۱۱ بوده است. همچنین نسبت جانشینی transition/transversion، برای بازهای پورین و پیریمیدین k1 برابر با ۰/۶۴ و k2 برابر ۰/۷۸ محاسبه شد. نرخ کل transition/transversion یا میزان (R) نیز برابر با ۰/۲۶ بود.

جدول ۱-۳-۱۳ ترکیب نوکلئوتیدها (درصد) در مناطق مختلف نمونه برداری شده از ماهی آزاد

	G	A	T	C
آستارا	۱۳/۰۵	۳۲/۷۸	۲۷/۹۷	۲۶/۱۹
چالوس	۱۳/۴۲	۳۲/۸۸	۲۷/۴۸	۲۶/۲۳
تنکابن	۱۳/۲۲	۳۲/۶۱	۲۸/۵۵	۲۵/۶۲
کرگانرود	۱۳/۰۹	۳۲/۵۸	۲۸/۰۴	۲۶/۲۹
سردابرو	۱۳/۵۷	۳۲/۵۵	۲۷/۶۵	۲۶/۲۳

جدول ۱-۳-۱۴ برآورد حداکثر احتمال ترکیب الگوی جانشینی نوکلئوتیدی در قطعه D-loop ماهی آزاد.

(میزان احتمال transition بصورت رنگی و بقیه اعدادی که شامل احتمال جانشینی Transversion هستند به صورت ایتالیک مشخص شده اند.

نوکلئوتید	A	T	C	G
A	–	۱۰/۶۱	۹/۵۲	۷/۷۲
T	۱۲/۴۰	–	۷/۴۷	۴/۲۶
C	۱۲/۴۰	۸/۳۲	–	۴/۲۶
G	۷/۹۱	۱۰/۶۱	۹/۵۲	–

تنوع ژنتیکی:

همانگونه که جدول ۱-۳-۱۵ نشان می دهد، بیشترین مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده شده (۰/۶۷) مربوط به نمونه های چالوس بوده و کمترین آن در رودخانه تنکابن (۰/۶۲) بوده است. بیشترین مقدار هتروزایگوسیتی مورد انتظار (۰/۳۷) در نمونه های سردابرو و کمترین مقدار آن مربوط به نمونه های کرگانرود (۰/۳۱) بوده است. قابل ذکر است که میانگین مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بین تمامی نمونه ها بترتیب 0.35 ± 0.61 و 0.12 ± 0.33 بوده است. بیشترین تنوع هاپلوتایپی (0.04 ± 0.89) مربوط به رودخانه سردابرو بوده و کمترین آن در نمونه های آستارا مشاهده شده است (0.02 ± 0.81). علاوه بر این بیشترین تنوع نوکلئوتیدی 0.07 ± 0.13 در رودخانه های سردابرو و چالوس و کمترین آن 0.06 ± 0.11 در رودخانه تنکابن مشاهده شده است. بطور کلی نتایج نشان داده که تنوع ژنتیکی در ماهی آزاد دریای خزر در سطح پائینی می باشد.

جدول ۱-۳-۱۵- سطوح تنوع ژنتیکی نمونه‌های ماهی آزاد در مناطق مختلف (تنوع هاپلوتایپی $h \pm S.D$ و تنوع نوکلئوتیدی $\pi \pm S.D$ ، هتروزیگوسیتی مشاهده شده H_0 ، هتروزیگوسیتی قابل انتظار H_E)

هاپلوتیپ	h	π	H_0	H_E
آستارا	۹	0.12 ± 0.06	0.46 ± 0.11	0.32 ± 0.16
چالوس	۱۳	0.13 ± 0.07	0.67 ± 0.09	0.32 ± 0.15
تنکابن	۱۲	0.11 ± 0.06	0.62 ± 0.08	0.32 ± 0.15
کرگانرود	۱۰	0.12 ± 0.05	0.66 ± 0.07	0.31 ± 0.15
سردابرو	۱۱	0.13 ± 0.07	0.65 ± 0.06	0.37 ± 0.14

فاصله ژنتیکی، تمایز ژنتیکی (F_{ST}):

ماتریس فواصل ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی (Nei 1972) محاسبه شده و در جدول ۱-۳-۱۶ آمده است. همانطور که در جدول ملاحظه می‌شود بیشترین فاصله ژنتیکی 0.12 و کمترین آن 0.09 می‌باشد. بطور کلی فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از مقدار کمی برخوردار می‌باشد. علاوه بر این فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های هر یک از رودخانه‌ها بترتیب آستارا 0.10 ، چالوس 0.12 ، تنکابن 0.09 ، کرگانرود 0.10 و سردابرو 0.10 بود.

جدول ۱-۳-۱۶ ماتریس فاصله ژنتیکی برحسب مناطق مختلف نمونه‌برداری ماهی آزاد

آستارا	چالوس	تنکابن	کرگانرود	سردابرو
0/00	0/11	0/10	0/09	0/10
	0/00	0/11	0/12	0/11
		0/00	0/11	0/10
			0/00	0/10
				0/00

بطور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی از فاکتور F_{ST} استفاده می‌گردد. نتایج بدست آمده از مقدار F_{ST} نشان می‌دهد که حداکثر آن (0.08) بین نمونه‌های چالوس با کرگانرود و تنکابن با کرگانرود و حداقل F_{ST} (0.01) بین نمونه‌های کرگانرود با آستارا مشاهده شده است (جدول ۱-۳-۱۷). براساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه‌های آستارا با چالوس، آستارا با تنکابن، چالوس با کرگانرود و تنکابن با کرگانرود معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

جدول ۱-۳-۱ مقدار F_{ST} محاسبه شده برای نواحی مختلف نمونه برداری ماهی آزاد (اعداد پائین ماتریکس مقدار F_{ST} بر اساس تست AMOVA و اعداد بالا مقادیر احتمال بر اساس ۹۹ بار تکرار)

آستارا	چالوس	تنکابن	کرگانرود	سردابروود
آستارا	0/00	۰/۰۱	۰/۰۸	۰/۱
چالوس	۰/۰۵	0/00	۰/۰۱	۰/۰۷
تنکابن	۰/۰۵	۰/۰۳	0/00	۰/۰۶
کرگانرود	۰/۰۱	۰/۰۸	0/00	۰/۰۱
سردابروود	۰/۰۳	۰/۰۶	۰/۰۴	0/00

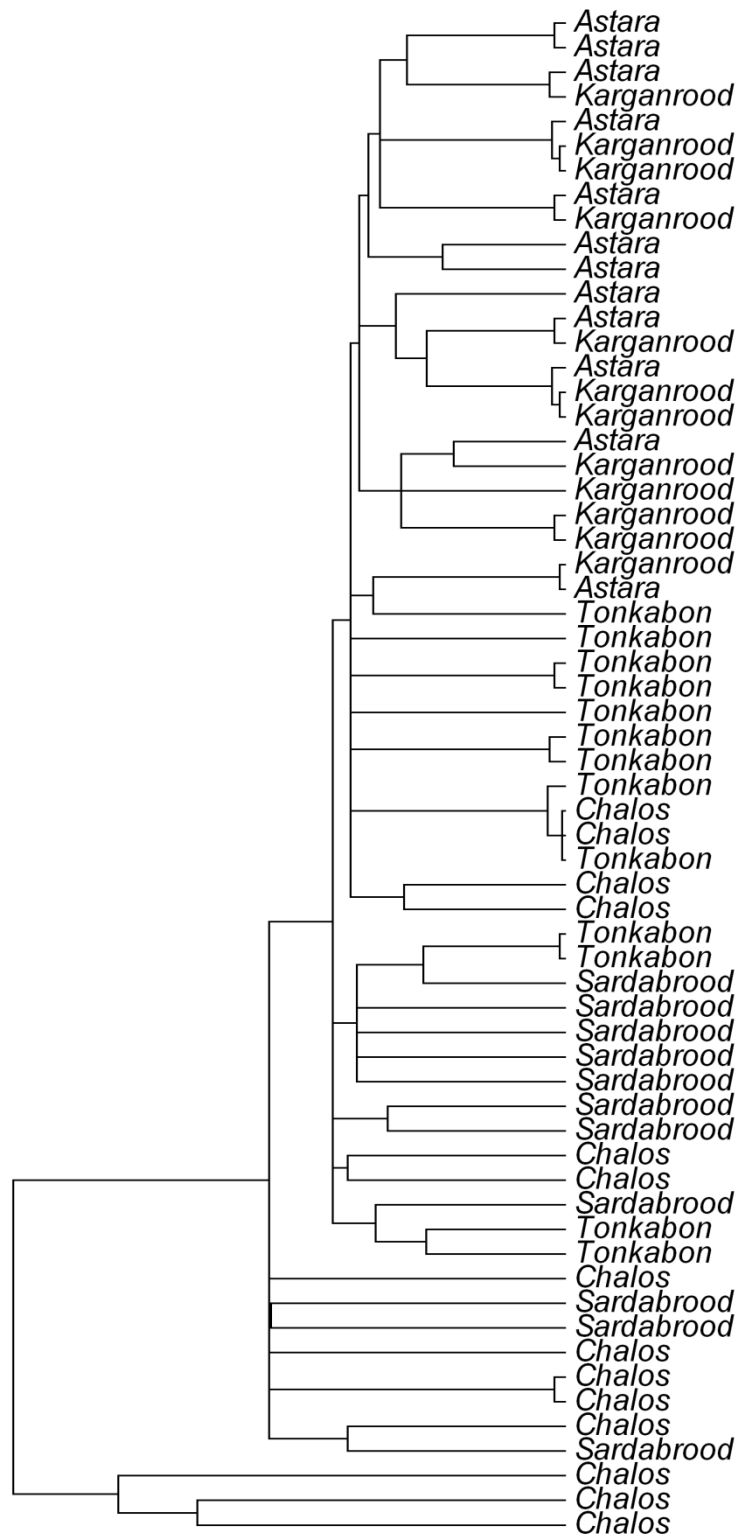
میانگین درجه خویشاوندی ماهی آزاد دریای خزر در رودخانه های مورد مطالعه با استفاده از آزمون Tajima محاسبه و مقدار $۰/۲۹ \pm ۰/۰۵$ بدست آمد. بر این اساس بیشترین درجه خویشاوندی ($۰/۳۴$) در رودخانه سردابروود و کمترین آن ($-۰/۴۲$) در رودخانه کرگانرود مشاهده شد (جدول ۱-۳-۱). با توجه به نتایج بدست آمده اختلاف درجه خویشاوندی بین رودخانه های نمونه برداری شده، معنی دار نبود ($P > ۰/۰۵$).

جدول ۱-۳-۱- درجه خویشاوندی ماهی آزاد دریای خزر در رودخانه های مورد مطالعه

آستارا	چالوس	تنکابن	کرگانرود	سردابروود	میانگین	انحراف معیار
-۰/۲۴	۰/۰۱	۰/۰۵	-۰/۴۲	۰/۳۴	-۰/۰۵	۰/۲۹

رسم درخت فیلوژنی (به روش Neighbor Joining) :

در روش Neighbor Joining درخت فیلوژنی حاصله به دو شاخه ی اصلی تقسیم شد که هر یک مجدداً به شاخه های مختلف تقسیم شده اند. در یک شاخه که به سه خوشه تقسیم شده است فقط نمونه های رودخانه چالوس جدا از سایر نمونه ها قرار گرفتند که نشان دهنده ی وجود فاصله ی ژنتیکی بین آنها می باشد (شکل ۱-۳-۳). سایر نمونه ها نیز در خوشه های مختلف قرار دارند. بطور کلی می توان نتیجه گیری کرد که توالی نوکلئوتیدی ماهیان آزاد دریای خزر به هم نزدیک می باشند.



شکل ۱-۳-۳- نمودار شجره ای نمونه های ماهی آزاد دریای خزر که بر اساس فاصله ژنتیکی (Nei,1972) و روش N.J. رسم شده است.

۴-۱-۳- ماهی سس

بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (یک درصد) و مشاهده تیزی و شدت باندهای تولید شده نشان داد که DNA استخراج شده از باله ماهی سس از کیفیت و کمیت مناسبی برای استفاده در آزمایش‌های PCR برخوردار می‌باشد. طول قطعه تکثیر شده در تمامی نمونه‌ها ۸۰۰ جفت باز بود. توالی قطعه D-loop نمونه‌های سس ماهی، با استفاده از برنامه BioEdit همتراز شدند. از مجموع ۸۰۰ جفت نوکلئوتید همتراز شده، ۲۴ جایگاه متغیر در توالی‌های مختلف مشاهده گردید. در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده، ۱۲ هاپلوتیپ مشاهده گردید که بیشترین تعداد در منطقه گیلان (۸ هاپلوتیپ) بوده است.

جدول ۱-۳-۱۹ فراوانی هاپلوتیپ‌ها را در مناطق مختلف نشان می‌دهد. همانگونه که مشاهده می‌شود، هاپلوتیپ‌های D، E و F مختص منطقه گیلان، هاپلوتیپ J و K مختص نمونه‌های سفیدرود و هاپلوتیپ L مربوط به رودخانه تجن می‌باشد. در نمونه‌های مازندران هاپلوتیپ اختصاصی مشاهده نگردید.

جدول ۱-۳-۱۹- فراوانی نسبی هاپلوتیپ‌های مشاهده شده در مناطق نمونه برداری شده سس ماهی

ردیف	هاپلوتیپ	گیلان	مازندران	سفیدرود	تجن
۱	A	۰/۲۳	۰/۳۱	۰	۰
۲	B	۰/۲۳	۰	۰/۲۰	۰
۳	C	۰/۰۸	۰	۰/۲۰	۰
۴	D	۰/۰۸	۰	۰	۰
۵	E	۰/۰۸	۰	۰	۰
۶	F	۰/۰۸	۰	۰	۰
۷	G	۰/۱۵	۰/۴۶	۰	۰/۴۰
۸	H	۰/۰۸	۰/۰۸	۰	۰
۹	I	۰	۰/۰۸	۰	۰
۱۰	J	۰	۰	۰/۴۰	۰
۱۱	K	۰	۰	۰/۲۰	۰
۱۲	L	۰	۰	۰	۰/۲۰

ترکیب نوکلئوتیدها در هر یک از مناطق نمونه برداری در جدول ۱-۳-۲۰ مشاهده می‌گردد. حداکثر احتمال ترکیبی الگوی نوکلئوتیدی و میزان احتمال جانشینی نوکلئوتیدی هر باز بر اساس روش Kumar و همکاران (۲۰۰۸) در جدول ۳-۲۱ محاسبه شده است. طبق محاسبات انجام شده درصد ترکیب بازهای نوکلئوتیدی در مجموع نمونه‌ها برای A، T، C و G به ترتیب ۰/۳۱، ۰/۲۶، ۰/۲۹ و ۰/۱۴ بوده است.

جدول ۱-۳-۲۰- ترکیب نوکلئوتیدها (درصد) در مناطق مختلف نمونه برداری شده از سس ماهی

G	A	T	C	
۱۳/۵۸	۳۰/۸۵	۲۶/۳۹	۲۹/۱۸	گیلان
۱۳/۴۹	۳۰/۹۱	۲۶/۳۴	۲۹/۲۶	مازندران
۱۳/۶۶	۳۱/۰۰	۲۶/۲۵	۲۹/۱۰	سفیدرود
۱۳/۴۹	۳۰/۹۷	۲۶/۲۷	۲۹/۲۶	تجن

جدول ۱-۳-۲۱- برآورد حداکثر احتمال ترکیب الگوی جانشینی نوکلئوتیدی درقطعه D-loop سس ماهی.

میزان احتمال جانشینی انتقالی با خانه های رنگی و بقیه اعدادی که شامل احتمال جانشینی Transversion هستند به صورت ایتالیک مشخص شده اند.

G	C	T	A	نوکلئوتید
۰	۱۴/۶۰	۱۳/۱۷	–	A
۶/۷۷	۰	–	۱۵/۴۵	T
۶/۷۷	–	۰	۱۵/۴۵	C
–	۱۴/۶۰	۱۳/۱۷	۰	G

تنوع ژنتیکی:

همانگونه که جدول ۱-۳-۲۲ نشان می دهد، بیشترین مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده شده (۰/۰۰۵) مربوط به نمونه های سفیدرود بوده و کمترین آن در رودخانه تجن (۰/۰۰۱) بوده است. بیشترین مقدار هتروزایگوسیتی مورد انتظار (۰/۵۷) در نمونه های سفیدرود و کمترین مقدار آن مربوط به نمونه های گیلان (۰/۲۷) بوده است. قابل ذکر است که میانگین مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بین تمامی نمونه ها بترتیب 0.003 ± 0.003 و 0.125 ± 0.42 بوده است. محاسبه ضرایب افت هتروزایگوسیتی نشان می دهد که در تمامی مناطق نمونه برداری افزایش هتروزایگوسیتی یا به عبارت دیگر بیشتر بودن مقادیر HE نسبت به HO وجود دارد که بیانگر افت شدید تنوع ژنتیکی در سس ماهی دریای خزر می باشد. بیشترین تنوع هاپلوتایپی (0.910 ± 0.021) مربوط به منطقه گیلان بوده و کمترین آن در نمونه های مازندران مشاهده شده است (0.14 ± 0.73). نتایج نشان دادند که تنوع هاپلوتایپی نمونه های رودخانه سفید رود با سایر نمونه ها از نظر آماری اختلاف معنی داری دارد ($P < 0.05$). علاوه بر این بیشترین تنوع نوکلئوتیدی 0.003 ± 0.005 در سفیدرود و کمترین آن 0.001 ± 0.001 در تجن مشاهده شده است. بطور کلی نتایج نشان داده که تنوع ژنتیکی در سس ماهی دریای خزر در سطح پائینی می باشد.

جدول ۱-۳-۲۲- سطوح تنوع ژنتیکی نمونه های سس ماهی در مناطق مختلف (تنوع هاپلوتایپی $h \pm S.D$ و تنوع نوکلئوتیدی $\pi \pm S.D$ ، هتروزیگوسیتی مشاهده شده H_0 ، هتروزیگوسیتی قابل انتظار H_E)

هاپلوتیپ	h	π	H_0	H_E	
گیلان	۸	0.003 ± 0.002	0.003 ± 0.002	0.27 ± 0.15	
مازندران	۵	0.002 ± 0.002	0.002 ± 0.001	0.34 ± 0.18	
سفیدرود	۴	0.005 ± 0.003	0.005 ± 0.003	0.57 ± 0.07	
تجن	۳	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.001	0.50 ± 0.145	

فاصله ژنتیکی، تمایز ژنتیکی (F_{ST}):

ماتریس فواصل و شباهت ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی (Nei 1972) محاسبه شده و در جدول ۱-۳-۲۳ آمده است. همانطوریکه در جدول ملاحظه می شود بیشترین فاصله ژنتیکی 0.004 و کمترین آن 0.002 می باشد. بطور کلی فاصله ژنتیکی بین نمونه های جمع آوری شده از مقدار کم برخوردار می باشد.

جدول ۱-۳-۲۳ ماتریس فاصله ژنتیکی بر حسب مناطق مختلف نمونه برداری سس ماهی

گیلان	مازندران	سفیدرود	تجن
گیلان	0/00	0.003	0.003
مازندران	0/00	0.004	0.002
سفیدرود		0/00	0.003
تجن			0/00

بطور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی از فاکتور F_{ST} استفاده می گردد. نتایج بدست آمده از مقدار F_{ST} نشان می دهد که حداکثر آن (0.31) بین نمونه های سفیدرود و تجن و حداقل F_{ST} (0.04) بین نمونه های مازندران و تجن مشاهده شده است (جدول ۱-۳-۲۴). بر اساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه های تجن با گیلان، مازندران با سفیدرود معنی دار بود ($P < 0.05$).

جدول ۱-۳-۲۴ مقدار F_{ST} محاسبه شده برای نواحی مختلف نمونه برداری سس ماهی (اعداد پائین ماتریکس مقدار F_{ST} بر اساس تست AMOVA و اعداد بالامقادیر احتمال با ۹۹ بار تکرار)

گیلان	مازندران	سفیدرود	تجن
گیلان	0/00	0.13	0.04
مازندران	0.05	0/00	0.35
سفیدرود	0.18	0.28	0/00
تجن	0.22	0.04	0.31

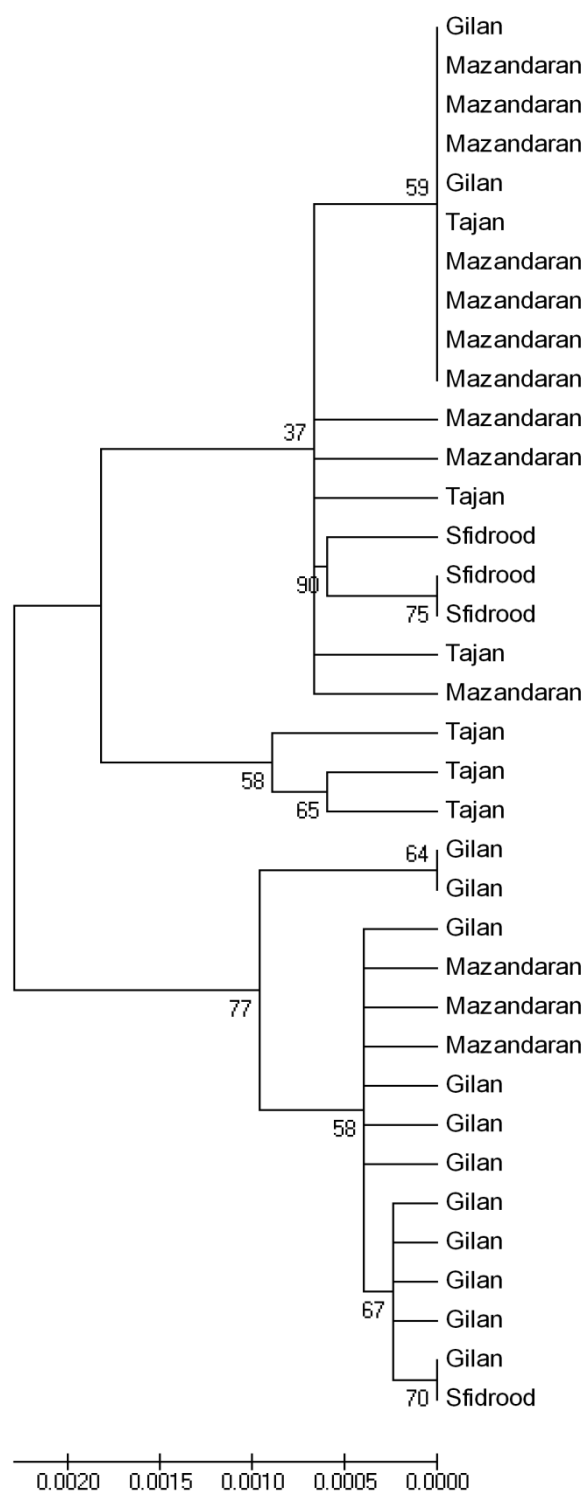
میانگین درجه خویشاوندی سس ماهی دریای خزر در رودخانه های مورد مطالعه با استفاده از آزمون Tajima محاسبه و مقدار $0/69 \pm 0/36$ بدست آمد. بر این اساس بیشترین درجه خویشاوندی ($1/33$) در رودخانه سفیدرود و کمترین آن ($-0/32$) در منطقه گیلان مشاهده شد (جدول ۱-۳-۲۵). با توجه به نتایج بدست آمده اختلاف درجه خویشاوندی بین رودخانه های نمونه برداری شده، معنی دار نبود ($P > 0/05$).

جدول ۱-۳-۲۵ درجه خویشاوندی سس ماهی دریای خزر در رودخانه های مورد مطالعه

گیلان	مازندران	سفیدرود	تجن	میانگین	انحراف معیار
-۰/۳۲	۰/۱۸	۱/۳۳	۰/۲۴	۰/۳۶	۰/۶۹

رسم درخت فیلوژنی (به روش Neighbor Joining):

در روش Neighbor Joining درخت فیلوژنی حاصل به دو شاخه ی اصلی تقسیم شد هر یک به شاخه های مختلف تقسیم شده اند. در یک شاخه بیشتر نمونه های گیلان و تعداد کمی از نمونه های مازندران قرار گرفته و در شاخه دیگر سایر نمونه های منطقه مازندران و رودخانه های تجن و سفیدرود قرار گرفته است. عدم تفکیک کامل نمونه ها از یکدیگر نشانه وجود فاصله ی ژنتیکی کم بین آنها می باشد (شکل ۱-۳-۴). بطور کلی می توان نتیجه گیری کرد که توالی نوکلئوتیدی ماهیان آزاد دریای خزر به هم نزدیک می باشند.



شکل ۱-۳-۴- نمودار شجره ای نمونه های سس ماهی دریای خزر که بر اساس فاصله ژنتیکی (Nei,1972) و روش N.J. رسم شده است.

۵-۱-۳- ماهی سوف

بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (یک درصد) و مشاهده تیزی و شدت باندهای تولید شده نشان داد که DNA استخراج شده از باله ماهی سوف از کیفیت و کمیت مناسبی برای استفاده در آزمایش‌های PCR برخوردار می‌باشد. همچنین تمامی ۷ جایگاه ریزماهواره بررسی شده در ماهی سوف، پلی‌مورف بوده که جزئیات آن در جدول ۱-۳-۲۶ آورده شده است.

جدول ۱-۳-۲۶ خصوصیات و نتایج بدست آمده از بررسی جایگاههای ریزماهواره در ماهی سوف

جایگاه	دمای اتصال °C	تعداد چرخه	محداده آلی (pb)	تعداد آلل
<i>PflaL1</i>	۵۰	۳۰	۱۱۲-۱۶۴	۱۱
<i>PflaL3</i>	۵۳	۳۰	۱۳۵-۱۷۱	۸
<i>PflaL5</i>	۵۳	۳۰	۱۳۵-۱۵۵	۶
<i>PflaL6</i>	۵۲	۳۰	۱۴۰-۲۴۸	۷
<i>PflaL7</i>	۵۳	۳۰	۱۶۱-۱۷۳	۴
<i>PflaL8</i>	۵۳	۳۰	۱۳۸-۱۵۰	۴
<i>PflaL9</i>	۵۳	۳۰	۲۳۲-۲۷۲	۱۰

آلهای واقعی و موثر:

همانگونه که جدول ۱-۳-۲۷ نشان می‌دهد، بیشترین تعداد آلل واقعی در جایگاه *PflaL3* و *PflaL9* مربوط به نمونه‌های مازندران و گلستان (۹ آلل) بوده و کمترین آن در جایگاه *PflaL8* (۳ آلل) می‌باشد. بیشترین تعداد آلل موثر ۶/۸۷ در جایگاه *PflaL1* در نمونه‌های گلستان و کمترین مقدار آن در جایگاه *PflaL7* مربوط به نمونه‌های مازندران (۰/۹۶ آلل) بوده است. بیشترین میانگین تعداد آلل‌های واقعی (۶/۵۷) در نمونه‌های گلستان و کمترین آن (۵/۸۶) در مازندران مشاهده شده است. ضمن اینکه بیشترین میانگین آلل موثر (۴/۲۷) در نمونه‌های گلستان و کمترین آن (۳/۴۸) در مازندران بود. قابل ذکر است که میانگین تعداد آلل‌های واقعی و موثر در بین تمامی نمونه‌ها بترتیب $6/14 \pm 0/45$ و $3/88 \pm 0/34$ بوده است.

جدول ۱-۳-۲۷ تعداد آلل واقعی (N_A) و موثر (N_E) جایگاه‌های بررسی شده در ماهی سوف

جایگاه	گیلان		مازندران		گلستان	
	N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A
<i>PflaL1</i>	۹	۶/۶۷	۷	۱/۷۲	۹	۶/۸۷
<i>PflaL3</i>	۸	۵/۰۸	۸	۱/۶۹	۸	۳۰۳/
<i>PflaL5</i>	۶	۴/۳۶	۶	۱/۵۳	۶	۵۵/۲
<i>PflaL6</i>	۶	۲/۵۹	۵	۰/۹۶	۶	۸۲/۴

گلستان		مازندران		گیلان		جایگاه
N_E	N_A	N_E	N_A	N_E	N_A	
۷۲/۶	۴	۰/۸۹	۴	۲/۶۶	۳	<i>PflaL7</i>
۲۲/۸	۴	۱/۰۲	۳	۳/۱۱	۳	<i>PflaL8</i>
۵۰۶/	۹	۱/۶۷۴	۸	۳/۷۸	۷	<i>PflaL9</i>
۴/۲۷	۶/۵۷	۳/۴۸	۵/۸۶	۳/۸۹	۶	میانگین
۰/۷۲	۰/۸۱	۰/۴۸	۰/۷۴	۰/۶۱	۰/۸۷	SE

تنوع ژنتیکی:

همانگونه که جدول ۱-۳-۲۸ نشان می دهد، بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۸۷) در جایگاه *PflaL5* در نمونه های گیلان و کمترین آن در جایگاه *PflaL9* (۰/۲۳) در گیلان بوده است. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۸۵) در جایگاه *PflaL1* در نمونه های گیلان و کمترین مقدار آن در جایگاه *PflaL7* مربوط به نمونه های مازندران (۰/۴۰) بوده است. بیشترین میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۶۱) در بین نمونه های گلستان و کمترین آن (۰/۶۱) در گیلان مشاهده شده است. ضمن اینکه بیشترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۷۲) در نمونه های گلستان و کمترین آن (۰/۶۷) در مازندران بود. قابل ذکر است که میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بین تمامی نمونه ها بترتیب 0.62 ± 0.02 و 0.62 ± 0.03 بوده است. محاسبه ضرایب افت هتروزیگوسیتی نشان می دهد که در اکثر مناطق نمونه برداری و در تمامی جایگاهها کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار وجود دارد.

جدول ۱-۳-۲۸ مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_O) و مورد انتظار (H_E) برای جایگاه های مورد

بررسی در ماهی سوف

گلستان		مازندران		گیلان		جایگاه
H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	
۰/۸۵	۷۰/۵	۰/۸۰	۷۰/۶	۰/۸۵	۰/۶۳	<i>PflaL1</i>
۷۰/۰	۷۰/۷	۰/۷۷	۰/۶	۰/۸۰	۰/۶۳	<i>PflaL3</i>
۱۰/۸	۰/۶۳	۶۰/۷	۰/۸	۰/۷۷	۷۰/۸	<i>PflaL5</i>
۶۰/۰	۰/۶۳	۸۰/۴	۷۰/۵	۰/۶۱	۷۰/۵	<i>PflaL6</i>
۰/۶۲۵	۷۰/۵	۰/۵۰	۰/۴	۰/۶۲	۰/۸	<i>PflaL7</i>
۵۰/۶	۰/۵۳	۷۰/۶	۰/۷	۳۰/۵	۰/۵۳	<i>PflaL8</i>
۵۰/۸	۰/۷۳	۰/۷۶	۰/۶	۰/۷۳	۰/۲۳	<i>PflaL9</i>
۰/۷۲	۰/۶۳	۰/۶۷	۰/۶۲	۰/۷۰	۰/۶۱	میانگین
۰/۰۴	۰/۰۳	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۴	۰/۰۸	SE

تبادل هاردی - واینبرگ:

به منظور بررسی تبادل هاردی واینبرگ در تمامی مناطق مورد بررسی وجایگاههای مختلف از آزمون χ^2 استفاده شد. نتایج نشان داد که اکثر نمونه ها در جایگاه های PflaL6 ، PflaL7 و PflaL8 انحراف از تبادل هاردی- واینبرگ ($P < 0.05$) را نشان دادند (جدول ۱-۳-۲۹).

جدول ۱-۳-۲۹ بررسی تبادل هاردی- واینبرگ در مناطق مختلف نمونه برداری ماهی سوف

منطقه	PflaL1	PflaL3	PflaL5	PflaL6	PflaL7	PflaL8	PflaL9
گیلان	۶۳/۹۸	۵۹/۰۴	۱۲/۴۷	۳۲/۸۳	۵/۱۲	۱/۰۳	۹۰/۲۷
	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۶۴	۰/۰۰۵	۰/۰۱۶	۰/۰۷۹	۰/۰۰۰
	**	**	ns	**	ns	ns	***
مازندران	۴۲/۸۰	۷۲/۷۲	۱۶/۸۳	۹/۷۵	۱۱/۰۹	۱/۴۰	۶۹/۱۶
	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰	۰/۰۳۳	۰/۰۴۶	۰/۰۸۸	۰/۰۷۰	۰/۰۰۰
	**	***	ns	ns	ns	ns	***
گلستان	۵۴/۶۷	۶۲/۲۵	۳۵/۱۸	۱۴/۷۲	۵/۲۶	۱۷/۲۳	۶۵/۹۵
	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰	۰/۰۰۲	۰/۰۴۷	۰/۰۵۱	۰/۰۰۸	۰/۰۰۲
	*	***	**	ns	ns	**	**

ns=not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

فاصله و شباهت ژنتیکی ، تمایز ژنتیکی (F_{ST}):

ماتریس فواصل و شباهت ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی (Nei (1972) محاسبه شده و در جدول ۱-۳-۳۰ آمده است. همانطوریکه در جدول ملاحظه می شود بیشترین فاصله ژنتیکی (0.14) بین نمونه های مازندران و گیلان می باشد. همچنین کمترین فاصله ژنتیکی (0.07) بین نمونه های گلستان و گیلان مشاهده شده است. بیشترین و کمترین شباهت ژنتیکی دقیقا برعکس فاصله ژنتیکی می باشد.

جدول ۱-۳-۳۰ ماتریس فاصله و شباهت ژنتیکی بر حسب مناطق مختلف نمونه برداری ماهی سوف (اعداد

بالای قطر مربوط به شباهت ژنتیکی و پائین قطر مربوط به فاصله ژنتیکی می باشد)

گیلان	مازندران	گلستان
گیلان	0/00	۰/۸۷
مازندران	۰/۱۴	0/00
گلستان	۰/۰۷	0/00

بطور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی از فاکتور F_{ST} استفاده می گردد.

نتایج بدست آمده از FST نشان می‌دهد که حداکثر آن (۰/۳۰) بین نمونه‌های گیلان با مازندران که دارای کمترین میزان جریان ژنی (۸/۱۸) است، مشاهده می‌شود. حداقل FST (۰/۰۱۴) بین نمونه‌های گیلان با گلستان که دارای بیشترین میزان جریان ژنی (۱۷/۶۹) است، مشاهده شده است (جدول ۱-۳-۱ و ۱-۳-۳). بر اساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه‌های گیلان با مازندران و گلستان با مازندران معنی دار بود ($P < 0.05$).

جدول ۱-۳-۱ میزان F_{ST} محاسبه شده برای نواحی مختلف نمونه برداری ماهی سوف (اعداد پائین ماتریکس میزان F_{ST} بر اساس تست AMOVA و اعداد بالا مقادیر احتمال بر اساس ۹۹ بار تکرار)

گیلان	مازندران	گلستان
گیلان	۰/۰۱	۰/۰۷
مازندران	۰/۰۳۰	۰/۰۱
گلستان	۰/۰۱۴	۰/۰۰

جدول ۱-۳-۲ میزان Nm محاسبه شده برای نواحی مختلف نمونه برداری ماهی سوف

گیلان	مازندران	گلستان
گیلان	۸/۱۸	۱۷/۶۹
مازندران	۰/۰۰	۱۱/۹۰
گلستان	۰/۰۰	۰/۰۰

۲-۳- نتایج خصوصیات مولدین و ارزیابی نمونه‌های اسپرم تازه

در این بررسی طول و وزن ماهیان آزاد نر به ترتیب $37/8 \pm 5/3$ سانتیمتر و $523/3 \pm 24/7$ گرم و طول و وزن ماهیان سفید نر به ترتیب $36/1 \pm 7$ سانتیمتر و $631/3 \pm 21/6$ گرم بود. نتایج ارزیابی اسپرم تازه مولدین نر آزاد و سفید در جدول ۱-۳-۲ آمده است.

جدول ۱-۳-۲ نتایج خصوصیات مولدین نر آزاد و سفید و اسپرم استحصالی از آنها

مولد	اسپرم استحصالی (ml)	درصد تحرک (%)	مدت تحرک (ثانیه)	تو اکم ($10^9/mL$)	اسمولالیت (OsmKg ⁻¹)	pH
آزاد	$4/5 \pm 3/4$	$39/5 \pm 2/8$	$37/3 \pm 6/7$	$3/6 \pm 0/8$	$282/6 \pm 13/8$	$7/35 \pm 0/3$
سفید	$3/5 \pm 0/9$	$36/7 \pm 2/4$	$33/5 \pm 7/8$	$1/9 \pm 0/6$	$341/6 \pm 15/8$	$7/65 \pm 0/5$

۱-۳-۲-۳ نتایج بررسی اسپرمهای منجمد شده

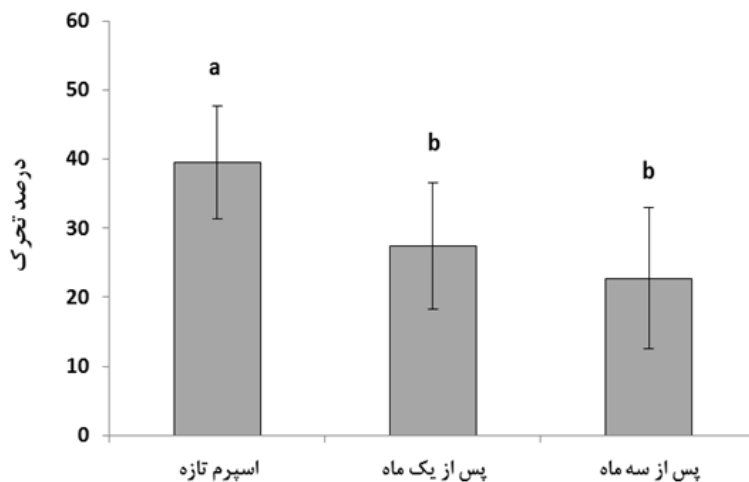
بررسی درصد تحرک و مدت زمان تحرک اسپرمها پس از انجماد زدایی طی مدت ۳۱ ماه پس از انجماد مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۲-۳-۲ آمده است. نتایج نشان داد که درصد تحرک در نمونه‌های اسپرم یک و سه ماه بعد از انجماد نسبت به اسپرم تازه بطور معنی‌داری کمتر شده بود (شکل ۲-۳-۳).

(۱). لیکن مدت تحرک علی‌رغم کاهش عددی تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های منجمد شده و تازه وجود نداشت (شکل ۲-۳-۲). لیکن در ماهیان سفید درصد تحرک و مدت زمان تحرک در نمونه‌های اسپرم یک و سه ماه بعد از انجماد نسبت به اسپرم تازه بطور معنی‌داری کمتر شده بود (شکل ۲-۳-۳ و ۲-۳-۴). همچنین درصد تحرک و مدت زمان تحرک نمونه‌های اسپرم ماهی سفید بعد از سه ماه انجماد بطور معنی‌داری کمتر از نمونه‌هایی بود که تنها یک ماه در شرایط انجماد نگهداری شده بودند.

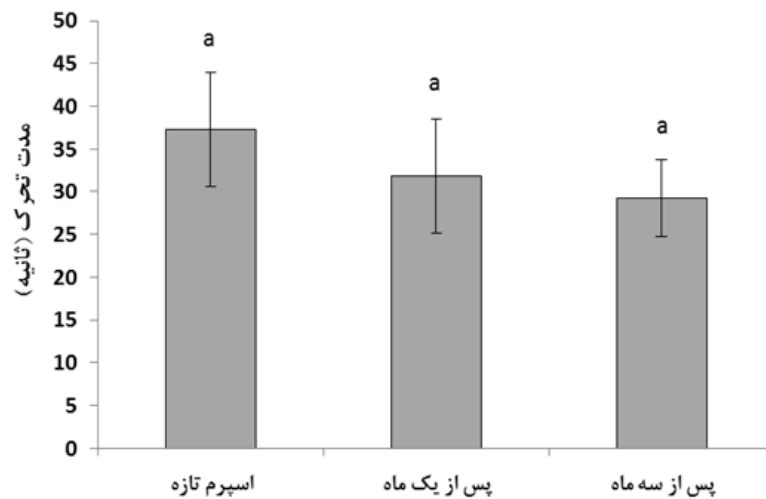
جدول ۲-۳-۲ - مقایسه خصوصیات تحرک اسپرم انجمادزدایی شده با اسپرم تازه در ماهیان آزاد و سفید دریای خزر

مولد	گذشت زمان (ماه)	درصد تحرک (%)	مدت تحرک (ثانیه)
ماهی آزاد	اسپرم تازه	$^{a}39.5 \pm 2.8$	$^{a}37.3 \pm 6.7$
	پس از یک ماه	$^{b}27.4 \pm 9.2$	$^{a}31.8 \pm 6.7$
	پس از ۳ ماه	$^{b}22.7 \pm 10.2$	$^{a}29.2 \pm 4.5$
ماهی سفید	اسپرم تازه	$^{a}36.7 \pm 2.4$	$^{a}33.5 \pm 7.8$
	پس از یک ماه	$^{b}26.1 \pm 3.5$	$^{b}25.1 \pm 9.3$
	پس از ۳ ماه	$^{c}16.7 \pm 5.23$	$^{c}19.9 \pm 3.7$

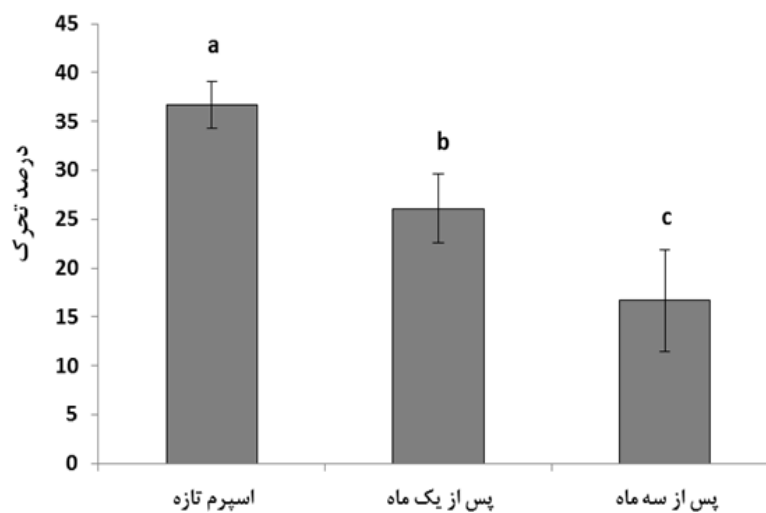
وجود علائم نامتشابه در هر ستون نشانه تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).



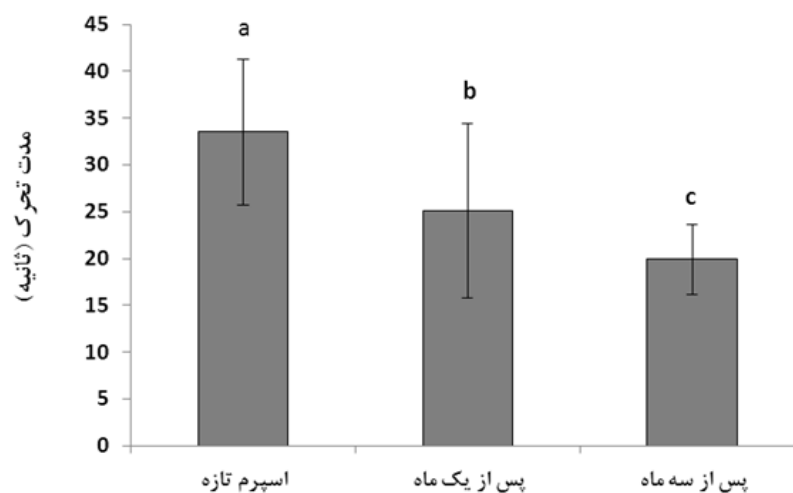
شکل ۲-۳-۱ - مقایسه درصد تحرک اسپرم ماهی آزاد در نمونه تازه، یک و دو ماه بعد از انجماد



شکل ۲-۳-۲ مقایسه مدت زمان تحرک اسپریم ماهی آزاد در نمونه تازه، یک و دو ماه بعد از انجماد



شکل ۲-۳-۳ مقایسه درصد تحرک اسپریم ماهی سفید در نمونه تازه، یک و دو ماه بعد از انجماد



شکل ۲-۳-۴ مقایسه مدت زمان تحرک اسپریم ماهی آزاد در نمونه تازه، یک و دو ماه بعد از انجماد

در ارزیابی ماندگاری اسپرم ماهی سفید از دو ماده محافظ سرما شامل گلیسرول با غلظت ۲٪ و اتیلن گلی کول با غلظت ۴٪ استفاده شد. نتایج نشان داد که نمونه اسپرمهایی که به آنها اتیلن گلی کول اضافه شده بود بعد از خارج شدن از انجماد همگی مرده بودند و تحرکی در این اسپرمها مشاهده نشد. این در حالی بود که در نمونه هایی که گلیسرول استفاده شده بود ماندگاری اسپرم کاملاً حفظ شده بود.

۳-۳- بررسی برخی از رودخانه های حوضه جنوبی دریای خزر

پس از تجزیه و تحلیل اطلاعات فون ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر چهار رودخانه مهم این حوضه شامل رودخانه های تجن، هراز، سردآبرود و چالوس برای انجام این مطالعه انتخاب شده که باستانای رودخانه تجن سایر رودخانه ها حفاظت شده می باشند. این رودخانه ها دارای تمامی نواحی اکولوژیک از ناحیه ماهی قزل آلا تا ناحیه ماهیان پهن بوده اند. در سال های اخیر کمترین تخریب زیستگاه در این رودخانه ها مخصوصاً در دو رودخانه سردآبرود و چالوس صورت گرفته و احتمالاً امکان بازسازی (Rehabilitation) آنها به منظور تکثیر طبیعی گونه های ماهیان در معرض خطر وجود دارد.

۳-۳-۱ - نتایج پارامتر های فیزیکی و شیمیایی آب در رودخانه های مورد مطالعه

۳-۳-۱-۱- رودخانه تجن

نتایج این مطالعه در رودخانه تجن نشان داد که میانگین دبی آب در ایستگاه ۶ در فصول مختلف سال بیشتر از سایر ایستگاه ها بوده و ایستگاه های ۴ و ۵ نسبت به ایستگاه های ۱ و ۲ افزایش معنی داری داشته است ($P \leq 0/05$). دمای آب از بالا دست به سمت پایین دست روند افزایشی داشت. قابل ذکر است که در فصول پاییز و زمستان دبی آب نسبت به سایر فصول سال در ایستگاه ۳ از میزان کمتری برخوردار می باشد. همچنین میزان آن در فصل بهار نسبت به سایر فصول افزایش داشته است. میانگین دامنه تغییرات pH در مدت بررسی بین حداقل آن در ایستگاه ۱ در فصل تابستان (۷/۶) و حداکثر آن در ایستگاه ۳ در فصل زمستان (۸/۳) ثبت گردید که بنظر می رسد تحت تأثیر فعالیت های انسانی، چندان تغییری نکرده است. مقدار آمونیوم (NH_4) و نیتريت (NO_2) در ایستگاه ۳ افزایش معنی داری را نسبت به سایر ایستگاه ها نشان داده است ($P \leq 0/05$).

پارامتر NO_3 در ایستگاه های مختلف مطالعاتی اختلاف معنی داری را نشان نداد و بین $0/6 \text{ mg/l}$ تا $6/1$ به ترتیب در ایستگاه های ۱ و ۶ متغیر می باشد.

حداکثر مقدار فسفات طی مدت بررسی در ایستگاه ۲ در فصل تابستان $0/37 \text{ mg/l}$ و حداقل آن $0/07 \text{ mg/l}$ در ایستگاه ۱ در فصل زمستان در نوسان بوده و اختلاف معنی داری بین ایستگاه های مورد مطالعه مشاهده نگردید ($p \leq 0/05$).

غلظت اکسیژن محلول (DO) در این مطالعه بین ۵/۵-۱۱/۹ (mg/l) متغیر بوده و ایستگاه های ۲ و ۵ خصوصاً در ماه های گرم سال، نسبت به سایر ایستگاه ها کاهش قابل توجهی داشتند ($P \leq 0/05$). این کاهش تحت تأثیر فعالیت های انسانی بویژه کارخانه چوب و کاغذ ساری بود. مقدار BOD_5 در ایستگاههای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ به ترتیب، ۳/۶، ۴، ۱۰/۹، ۶/۲ و ۴/۲ اندازه گیری شده که بعد از کارگاه پرورش ماهی از حداکثر مقدار برخوردار بود. نتایج حاصل از پارامتر TDS نشان داد میزان این پارامتر در ایستگاه ۲ نسبت به ایستگاه ۱ افزایش معنی داری یافته است ($P \leq 0/05$). میزان کدورت آب از صفر در ایستگاه ۱ تا ۳۳۳ NTU ۶، متغیر بود که به شدت تحت تأثیر کارگاه های شن و ماسه است.

۲-۱-۳-۳- رودخانه هراز

برخی از مهمترین پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب رودخانه هراز در ۱۱ ایستگاه نمونه برداری تعیین شده در رودخانه هراز و مهمترین سرشاخه های آن در مناسب ترین زمان سال (مرداد ماه) در جدول ۱-۳-۳-۱ آمده است. پارامترهای TDS و EC در نواحی ابتدایی سرشاخه های لاسم و بلده از مقادیر کمتری برخوردار بودند (ایستگاه های ۱، ۵ و ۶).

جدول ۱-۳-۳-۱: برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ایستگاه های مورد مطالعه در رودخانه هراز

شماره ایستگاه	خصوصیات شیمیایی آب			
	DO (mg/L)	دمای آب (ساعتی گراد)	EC (μs/cm)	شوری (درصد)
۱	۱۹۴/۲	۰/۲	۳۸۸	۱۶/۳
۲	۲۶۵	۰/۳	۵۲۹	۲۱/۳
۳	۲۳۹	۰/۲	۴۷۸	۱۸/۲
۴	۲۱۹	۰/۲	۴۳۸	۱۶/۸
۵	۱۵۲/۷	۰/۱	۳۰۵	۱۸/۴
۶	۹۵/۷	۰/۱	۱۹۱/۴	۱۳/۳
۷	۳۲۰	۰/۳	۶۴۱	۱۸/۴
۸	۱۵۰/۱	۰/۱	۳۰۲	۱۴/۳
۹	۵۲۷	۰/۵	۱۰۵۴	۱۸/۴
۱۰	۲۸۷	۰/۳	۵۷۶	۲۳/۹
۱۱	۲۸۶	۰/۳	۵۷۲	۲۶/۱

فعالیت های کارگاه های پرورش ماهیان سردآبی یکی از شدیدترین فعالیت های انسانی موثر بر اکوسیستم رودخانه هراز بوده، لذا با تعیین ۱۰ ایستگاه جداگانه (در فاصله بین ایستگاه های اصلی ۲ و ۳) در بالا و پایین دست کارگاه ها، اثرات یکی از مهمترین کاربری های این رودخانه بصورت فصلی مورد بررسی قرار گرفته که در ذیل آمده است.

اکسیژن محلول: در مدت بررسی میانگین اکسیژن محلول در ایستگاه های مختلف بین ۸/۷ (ایستگاه ۷) و ۱۰/۲ میلی گرم در لیتر (ایستگاه ۱) متغیر بود. مقدار این پارامتر در ایستگاه ۷ (پایین دست کارگاه) با ایستگاه های ۱ و ۴ (بالادست کارگاه) اختلاف معنی داری را نشان داد ($P < 0/05$). حداقل مقدار اکسیژن محلول را ایستگاه ۷ (۷/۶) در تابستان نشان داد.

اکسیژن مورد نیاز زیستی: حداقل مقدار متوسط آن ۱/۲ در زمستان (ایستگاه های ۱، ۲ و ۴) و حداکثر آن ۶/۸ در تابستان (ایستگاه ۷) بدست آمد.

فسفر: مقدار متوسط فسفر بین ۰/۰۱۴ و ۰/۱۱۵ میلی گرم در لیتر به ترتیب در ایستگاه های ۲ و ۷ متغیر بود. حداقل و حداکثر مقدار متوسط آن به ترتیب در ایستگاه ۲ در زمستان (۰/۰۰۸) و در ایستگاه ۷ در تابستان (۰/۲۱۵) بدست آمد. PO_4 در مناطقی بلافاصله بعد از هر مزرعه نسبت به قبل آنها بیشتر بوده، ولی اختلاف معنی داری را نشان ندادند ($P \geq 0/05$). مقدار آن در تابستان با سایر فصول سال اختلاف معنی داری را نشان داد ($P < 0/05$).

ازت (آمونیوم- نیتريت- نترات): مقدار متوسط آمونیوم بین ۰/۰۱۴ و ۰/۷۸۳ میلی گرم در لیتر به ترتیب در ایستگاه های ۱ و ۷ بدست آمد. این پارامتر در فصول گرمتر سال و در ایستگاه های بعد از هر مزرعه نسبت به قبل آنها از مقادیر بیشتری برخوردار بوده، بطوری که حداقل و حداکثر مقدار متوسط آن به ترتیب ۰/۰۱ (ایستگاه ۱) در زمستان و بهار) و ۲/۰۷ (ایستگاه ۷ در تابستان) بدست آمد. مقدار آمونیوم ایستگاه ۷ با ایستگاه های ۱، ۲، ۴ و ۶ اختلاف معنی داری را نشان داد ($P < 0/05$). همچنین مقدار آن در تابستان با سایر فصول سال اختلاف معنی داری را نشان داد ($P < 0/05$).

مقدار متوسط نیتريت بین ۰/۰۰۳ و ۰/۰۲۱ میلی گرم در لیتر به ترتیب در ایستگاه های ۲ و ۱۰ متغیر بود. مقدار آن در ایستگاه های بلافاصله بعد از هر مزرعه نسبت به قبل آنها بیشتر بوده، که بین ایستگاه ها و در فصول مختلف سال اختلاف معنی داری دیده نشد ($P \geq 0/05$).

مقدار متوسط نترات بین ۰/۷۴ و ۱/۴۹ میلی گرم در لیتر به ترتیب در ایستگاه های ۷ و ۱ بدست آمد. نترات معمولاً در ایستگاه های با فاصله ۱/۵ تا ۲ کیلومتری بعد از هر مزرعه از مقادیر بیشتری نسبت به ایستگاه های بلافاصله بعد از هر مزرعه برخوردار بود. حداقل مقدار متوسط نترات ۰/۳۳ در ایستگاه ۱۰ (در زمستان) و حداکثر آن ۲/۰۸ در ایستگاه های ۱ و ۸ (در پاییز) اندازه گیری شده که بین ایستگاه ها اختلاف معنی داری را نشان نداد ($P \geq 0/05$) و مقدار آن در تابستان با سایر فصول سال اختلاف معنی داری را نشان داد ($P < 0/05$).

کل مواد جامد معلق: کمترین مقدار متوسط TSS در ایستگاه ۲ (۶۲ میلی گرم در لیتر) و بیشترین مقدار آن در ایستگاه ۷ (۱۵۶) بدست آمد. مقدار آن در ایستگاه های بلافاصله بعد از هر مزرعه نسبت به قبل آنها بیشتر بوده ، ولی فقط ایستگاه ۹ (پایین دست تمامی کارگاه ها) با ایستگاه های ۱ و ۲ (بالادست تمامی کارگاه ها) اختلاف معنی داری را نشان داد ($P < 0/05$). ضمن اینکه در فصول گرمتر سال از مقدار بیشتری برخوردار بود.

۳-۳-۱-۳- رودخانه سردآبرود

نتایج حاصل از اندازه گیری پارامترهای فیزیکی و شیمیایی و فلزات سنگین آب رودخانه سردآبرود در فصل مربوط به ۴ ایستگاه انتخاب شده در جدول (۱-۳-۳-۲) آورده شده است.

جدول ۱-۳-۳-۲: نتایج پارامترهای فیزیکوشیمیایی و فلزات سنگین آب ایستگاه های رودخانه سردآبرود

ایستگاهها پارامترها	۱	۲	۳	۴	کل
دمای آب ($^{\circ}\text{C}$)	6.3 ± 2.7	7.9 ± 2.4	11.4 ± 3.5	14.3 ± 3	10 ± 3.5
دمای هوا ($^{\circ}\text{C}$)	14.5 ± 4.8	15 ± 4.87	$19/8 \pm 4.9$	$23/3 \pm 4.6$	18.1 ± 4.18
EC ($\mu\text{m/cm}$)	272 ± 136	312 ± 149	331 ± 152	386 ± 161	325.25 ± 48
pH	$7/5 \pm 0.7$	8 ± 0.5	$8/2 \pm 0.6$	$8/5 \pm 0.5$	8.05 ± 0.4
DO (mg/Lit)	10 ± 0.8	$9/2 \pm 0.7$	$8/2 \pm 0.5$	$7/5 \pm 0.2$	8.7 ± 1
TDS (mg/Lit)	208 ± 35	238 ± 32	256 ± 32	310 ± 40	253 ± 43
TSS (mg/Lit)	37 ± 10	55 ± 19	72 ± 34	85 ± 40	62.25 ± 21
BOD ₅ (mg/Lit)	$2/9 \pm 1.6$	4 ± 1.9	$4/6 \pm 2.1$	$5/2 \pm 2.8$	4.2 ± 1
NH ₄ (mg/Lit)	$0/01 \pm 0.01$	$0/018 \pm 0.01$	$0/17 \pm 0.3$	$0/25 \pm 0.4$	0.11 ± 0.12
PO ₄ (mg/Lit)	0.06 ± 0.04	0.33 ± 0.3	0.45 ± 0.3	0.8 ± 0.7	0.41 ± 0.3
NO ₂ (mg/Lit)	0.005 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.019 ± 0.01	0.026 ± 0.015	0.015 ± 0.009
NO ₃ (mg/Lit)	0.55 ± 0.4	1 ± 0.6	1.4 ± 0.9	2.1 ± 1.1	1.26 ± 0.65
Fe (mg/Lit)	0.28 ± 0.4	3.16 ± 0.8	11.25 ± 3.9	19 ± 4	8.42 ± 8
Pb (mg/Lit)	0.18 ± 0.1	0.27 ± 0.1	0.35 ± 0.18	0.72 ± 0.2	0.38 ± 0.2

اکسیژن محلول: اکسیژن محلول بطور متوسط در کل ایستگاه ها $8/7 \pm 1$ اندازه گیری شد. تغییرات این پارامتر از ایستگاه ۱ به سمت ایستگاه ۴ روند کاهشی را نشان داد.

کل مواد جامد محلول: حداکثر مقدار متوسط TDS ، 310 ppm در ایستگاه ۴ و حداقل آن 208 در ایستگاه ۱ با میانگین 253 ± 43 در تمامی ایستگاه ها ثبت شده است.

اکسیژن مورد نیاز زیستی: مقدار BOD₅ در تابستان با سایر فصول سال اختلاف معنی داری نشان داد ($P < 0/05$).

آمونیم (NH_4) ، نیتريت (NO_2) ، نیترات (NO_3): در بین ایستگاه ها اختلاف معنی داری دیده نشد ($P \geq 0/05$).

فسفر PO_4 : مقدار فسفر از ایستگاه ۱ به سمت پایین دست افزایش یافت ولی اختلاف معنی داری را نشان ندادند ($P \geq 0.05$). حداقل مقدار متوسط آن در ایستگاه ۱ (0.06) و حداکثر آن 0.8 میلی گرم در لیتر در ایستگاه ۴ متغیر بود.

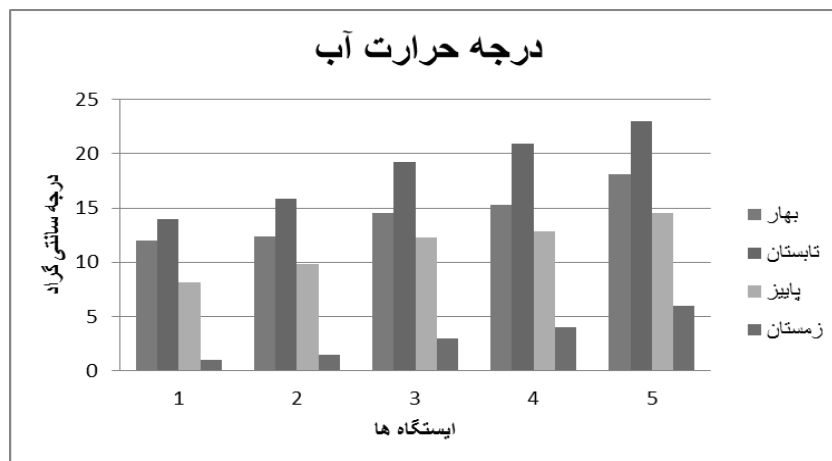
آهن: بررسی میزان آهن در ایستگاه‌های نمونه برداری نشان داد که بیشترین مقدار متوسط آهن محلول در آب در ایستگاه ۴ به میزان 19 میلی گرم در لیتر و کمترین آن در ایستگاه ۱ به مقدار 0.28 میلی گرم در لیتر بود. روند تغییرات آهن تا ایستگاه شماره ۲ آرام و از ایستگاه شماره ۲ تا ۴ سریع بود.

سرب:

نتایج مربوط به میزان سرب رودخانه نشان داد که بیشترین مقدار سرب در ایستگاه شماره ۴ به میزان متوسط 0.72 و کمترین آن در ایستگاه شماره ۱ به مقدار 0.18 میلی گرم در لیتر مشاهده گردید. روند صعودی سرب از بالادست رودخانه به پایین دست آن تقریباً یکنواخت بود.

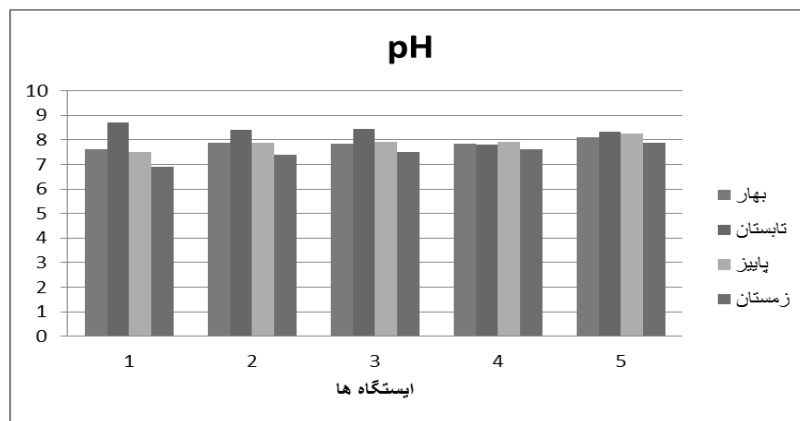
۴-۱-۳-۳- رودخانه چالوس

درجه حرارت آب: حداقل مقدار متوسط درجه حرارت آب در ایستگاه ۱ (10.34 درجه سانتی‌گراد) و حداکثر مقدار آن در ایستگاه ۵ (17.3 درجه سانتی‌گراد) ثبت شده است. نوسانات درجه حرارت آب در فصول مختلف سال در شکل ۱-۳-۳-۱ نشان داده شده است.



شکل ۱-۳-۳-۱- میانگین نوسانات درجه حرارت آب در فصول مختلف در رودخانه چالوس

pH: نوسانات pH آب در فصول مختلف سال در شکل ۱-۳-۳-۲ نشان داده شده است.



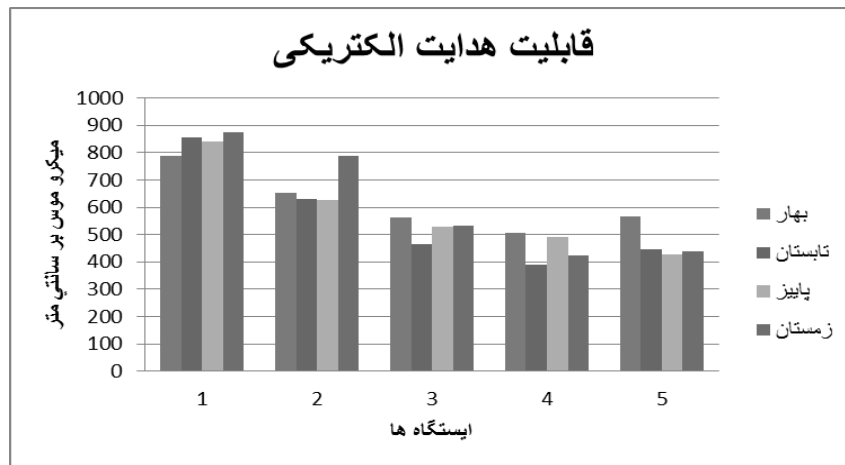
شکل ۱-۳-۳-۲- میانگین نوسانات pH در فصول مختلف در رودخانه چالوس

اکسیژن محلول: مقدار متوسط اکسیژن محلول بین ۶/۹۵ و ۹/۶ میلی گرم در لیتر به ترتیب در ایستگاه ۵ و ۱ متغیر بود شکل (۱-۳-۳-۳). مقدار اکسیژن محلول در ایستگاه ۵ با سایر ایستگاه ها و ایستگاه ۱ و ۲ با ایستگاه ۳ و ۴ اختلاف معنی داری نشان داده است ($P < 0.05$).



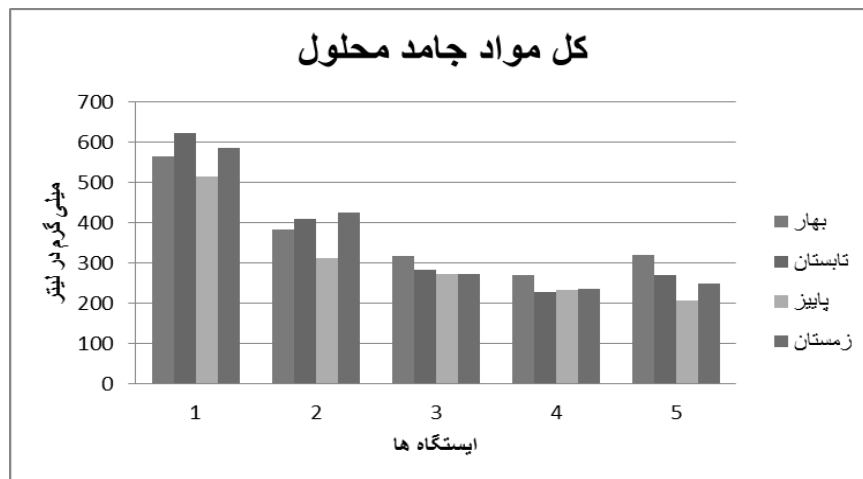
شکل ۱-۳-۳-۳- میانگین نوسانات DO در فصول مختلف در رودخانه چالوس

قابلیت هدایت الکتریکی: مقدار قابلیت هدایت الکتریکی ایستگاه ۱ با سایر ایستگاه ها و ایستگاه ۲ نیز با سایر ایستگاه ها اختلاف معنی داری داشت ($P < 0.05$) (شکل ۱-۳-۳-۴).



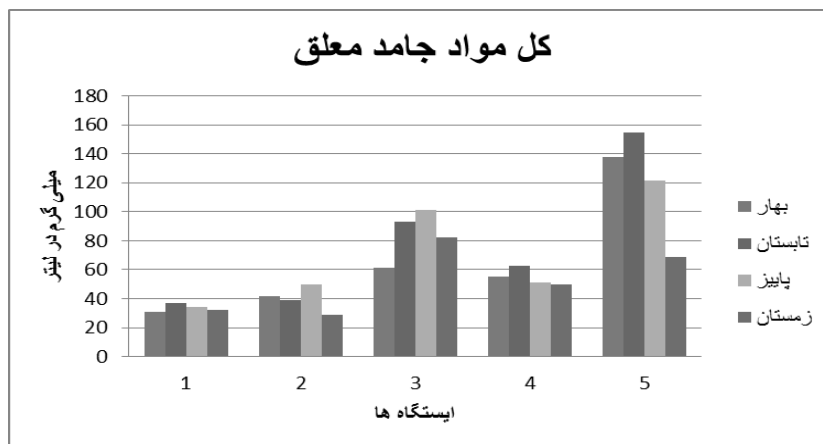
شکل ۱-۳-۴ میانگین نوسانات EC در فصول مختلف در رودخانه چالوس

کل مواد جامد محلول: مقدار متوسط TDS بین ۲۴۲ و ۵۶۹ میلی گرم در لیتر به ترتیب در ایستگاه ۴ و ۱ بدست آمد (شکل ۱-۳-۵).



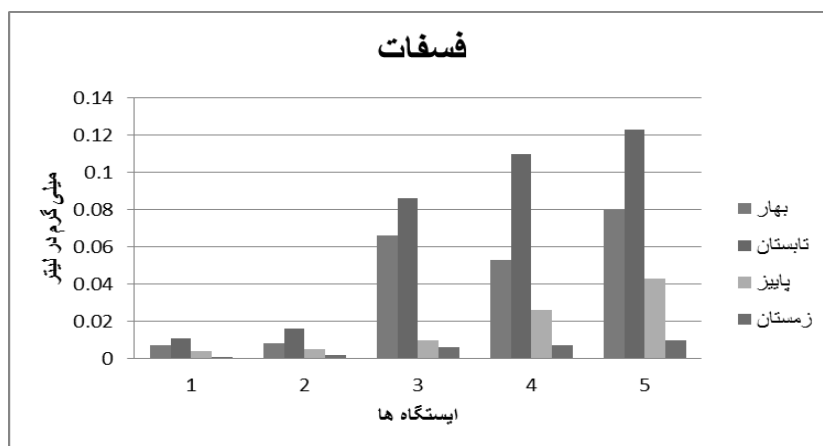
شکل ۱-۳-۵ میانگین نوسانات TDS در فصول مختلف در رودخانه چالوس

کل مواد جامد معلق: حداقل مقدار متوسط TSS در ایستگاه ۱ (۳۳ میلی گرم در لیتر) و حداکثر در ایستگاه ۵ (۱۳۱ میلی گرم در لیتر) ثبت شد. مقدار این پارامتر در تابستان بیشتر بود (شکل ۱-۳-۶). مقدار TSS در ایستگاه‌های مختلف، بجز ایستگاه ۱ با ۲ و ۴ با ۲ در بقیه موارد اختلاف معنی دار نشان داده شد ($P < 0.05$).



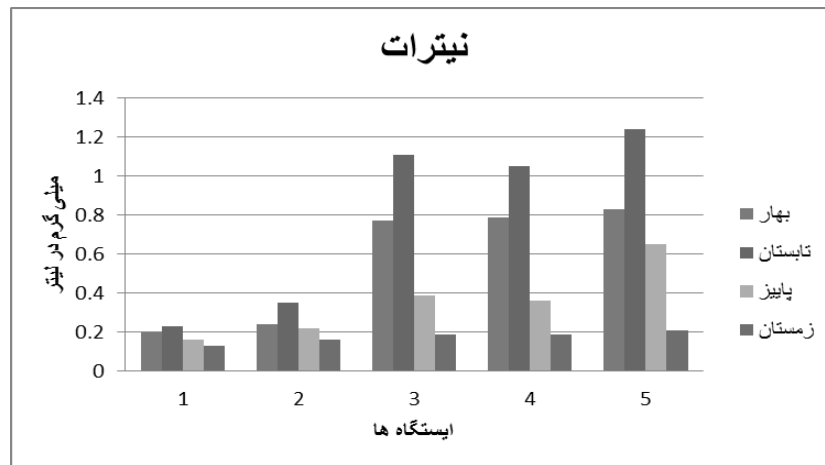
شکل ۱-۳-۳-۶ میانگین نوسانات TSS در فصول مختلف در رودخانه چالوس

فسفات: حداقل و حداکثر مقدار فسفات به ترتیب ۰/۰۰۱ میلی گرم در لیتر در زمستان (ایستگاه ۱) و ۰/۱۴ میلی گرم در لیتر در تابستان (ایستگاه ۵) بدست آمد (شکل ۱-۳-۳-۷). مقدار PO_4 در ایستگاه ۱ و ۲ با سایر ایستگاه ها اختلاف معنی داری نشان داد ($P < 0/05$).



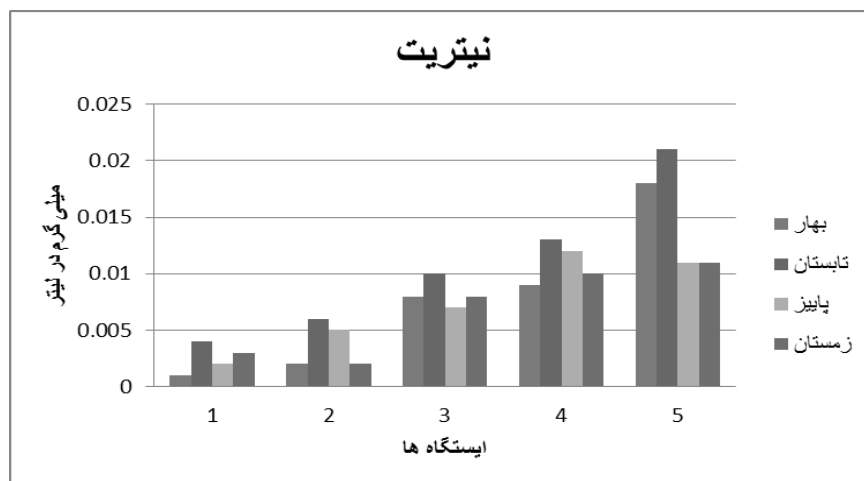
شکل ۱-۳-۳-۷ میانگین نوسانات فسفات در فصول مختلف در رودخانه چالوس

نیترات: حداقل و حداکثر مقدار نیترات به ترتیب ۰/۱۳ میلی گرم در لیتر در زمستان (ایستگاه ۱) و ۱/۴۵ میلی گرم در لیتر در تابستان (ایستگاه ۵) بدست آمد (شکل ۱-۳-۳-۸). مقدار NO_3 در ایستگاه ۱ و ۲ با سایر ایستگاه ها اختلاف معنی داری نشان داد ($P > 0/05$).



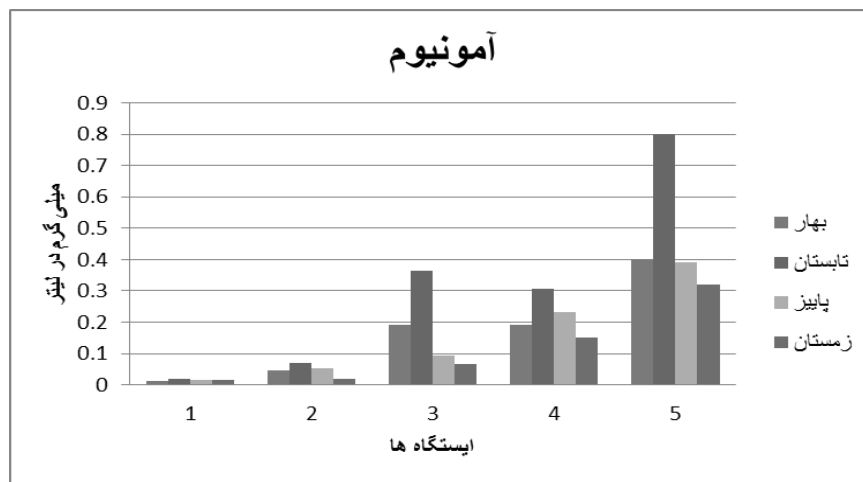
شکل ۱-۳-۳ میانگین نوسانات نیترات در فصول مختلف در رودخانه چالوس

نیتريت: حداقل و حداکثر مقدار نیتريت به ترتیب ۰/۰۰۱ میلی گرم در لیتر در بهار (ایستگاه ۱) و ۰/۰۲۶ میلی گرم در لیتر در تابستان (ایستگاه ۵) بدست آمد (شکل ۱-۳-۳). مقدار NO_2 در ایستگاه ۵ با سایر ایستگاه‌ها و همچنین ایستگاه ۱ و ۲ با ۳ و ۴ اختلاف معنی داری نشان داد ($P < 0.05$).



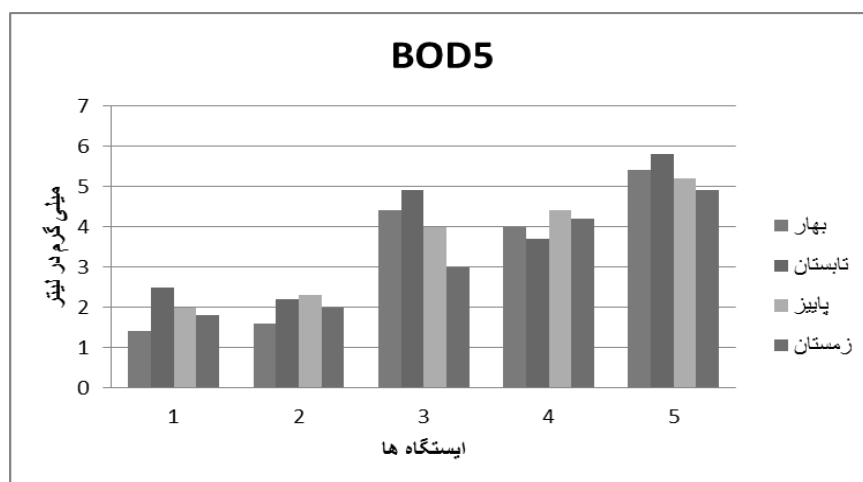
شکل ۱-۳-۴ میانگین نوسانات نیتريت در فصول مختلف در رودخانه چالوس

آمونيووم: حداقل و حداکثر مقدار آمونیوم به ترتیب در ایستگاه ۱ (۰/۰۱ میلی گرم در لیتر در بهار) و ایستگاه ۵ (۰/۹ میلی گرم در لیتر در تابستان) بدست آمد (شکل ۱-۳-۴). مقدار NH_4 در ایستگاه ۵ با سایر ایستگاه‌ها و همچنین ایستگاه ۱ و ۲ با ۳ و ۴ اختلاف معنی داری نشان داد ($P > 0.05$).



شکل ۱-۳-۱۰ میانگین نوسانات آمونیم در فصول مختلف در رودخانه چالوس

اکسیژن مورد نیاز زیستی: حداقل مقدار BOD_5 ، ۱ میلی گرم در لیتر در بهار (ایستگاه ۲) و حداکثر مقدار آن ۶/۲ میلی گرم در لیتر در تابستان (ایستگاه ۵) اندازه گیری شد (شکل ۱-۳-۱۱).



شکل ۱-۳-۱۱ میانگین نوسانات BOD_5 در فصول مختلف در رودخانه چالوس

۳-۳-۲ - نتایج بزرگ بی مهرگان کفزی

در مدت یک سال نمونه برداری از ایستگاه های مطالعاتی در چهار رودخانه مورد مطالعه در مجموع ۵۳ تاکسون شناسایی شدند (جدول ۲-۴). در رودخانه تجن ۳۴۰۰۰ نمونه کف زی جداسازی که متعلق به ۴۷ تاکسون بودند، در رودخانه هراز ۱۰۰۰۰۰ نمونه کف زی جداسازی شدند که متعلق به ۴۲ تاکسون بوده و در رودخانه های سردآبرود و چالوس به ترتیب ۱۸۴۹۰ و ۱۶۲۰۰ بزرگ بی مهرگان جداسازی و به ترتیب متعلق به ۲۸ و ۲۹ تاکسون بودند (جدول ۲-۳-۱).

جدول ۲-۳-۱ تاکسون‌های بزرگ بی مهرگان کفزی شناسایی شده در رودخانه‌های مورد مطالعه

نام تاکسون	تجن	هراز	سردآبرود	چالوس
<i>Epeorus</i>	+	+	+	+
<i>Heptagenia</i>	+	+	+	+
<i>Rhithrogena</i>	+	+	-	-
<i>Acentrella</i>	+	+	+	+
<i>Baetis</i>	+	+	+	+
<i>Cloeon</i>	+	+	+	+
Ephemerellidae	+	+	+	+
Ecdyonuridae	+	-	-	-
<i>Ephemera</i>	-	+	-	-
Oligoneuriidae	-	-	-	-
Nemouridae	+	-	-	-
Capniidae	+	-	-	-
Chloroperlidae	+	+	+	+
Leuctridae	+	-	+	+
Taeniopterygidae	-	-	-	-
<i>Glossosoma</i>	+	+	+	+
Lepidostomatidae	+	+	-	-
<i>Philopotamus</i>	-	+	+	-
<i>Psychomyia</i>	+	+	+	-
<i>Rhyacophila</i>	+	+	+	+
<i>Agraylea</i>	+	+	-	-
<i>Economus</i>	+	+	-	-
<i>Seicostoma</i>	+	+	+	+
<i>Hydroptila</i>	+	+	-	-
<i>Hydropsyche</i>	+	+	+	+
Odonata	+	+	-	+
Chironomidae	-	+	+	+
<i>Limnophora</i>	+	+	+	+
<i>Blepharicera</i>	+	+	+	+
Ceratopogonidae	+	+	-	-
Limonidae	-	+	+	+
Rhagionidae	+	+	-	-
<i>Tabanus</i>	+	+	+	+
Simuliidae	+	+	+	+
Pediciidae	+	-	-	-
<i>Tipula</i>	+	+	-	+
Dytiscidae	+	+	+	+
Elmidae	+	+	+	+
Gerridae	+	+	-	-
Gammaridae	+	+	+	+
Planariidae	+	+	+	+
Erpobdellidae	+	+	-	-
Haplotaxidae	+	-	-	-
Glossiphonia	+	-	-	-
<i>Phagocata</i>	+	-	+	+
<i>Oligochaeta</i>	+	+	-	-
Naididae	+	-	-	-
Potamopyrgus	+	+	+	+
<i>Planorbis</i>	+	+	-	-
<i>Pisidium</i>	-	+	+	+
<i>Physa</i>	+	+	+	+
Arachnida	+	+	-	+
Decapoda	+	-	-	-

نتایج این مطالعه در رودخانه تجن نشان داد که ایستگاه های مطالعاتی بر اساس شاخص HFBI در چهار طبقه کیفی عالی، خوب، مناسب و نسبتاً ضعیف قرار گرفتند (Lenat, 1993; Volker et al., 2000) (جدول ۲-۳-۳-۲).

جدول ۲-۳-۳-۲ شاخص زیستی هیلسنهوف در ایستگاه های مطالعاتی رودخانه تجن						
ایستگاه ۱	۲	۳	۴	۵	۶	فصل
۳/۰۳	۵/۱۹	۴/۷۷	۴/۷۲	۵/۱	۴/۹۵	پاییز
۳/۵	۵/۳۵	۴/۵۹	۴/۸۲	۶/۲۱	۵/۳۱	زمستان
۲/۳۲	۵/۲۳	۴/۸۵	۴/۹۶	۵/۹۹	۵/۱۷	بهار
۲/۵۱	۵/۲۳	۴/۵۳	۳/۴۳	۶/۷۲	۵/۷۵	تابستان
۲/۸۴ ^a	۵/۲۵ ^b	۴/۸۶ ^b	۴/۴۸ ^b	۶/۰۱ ^c	۵/۳۰ ^{bc}	متوسط سال
عالی	نسبتاً خوب	خوب	خوب	نسبتاً بد	نسبتاً خوب	کیفیت آب

- حروف کوچک نشان دهنده اختلاف معنی دار در بین ایستگاه های مورد مطالعه می باشد.

بطور متوسط در مدت یک سال بررسی در ایستگاه های مورد مطالعه، ایستگاه ۱ کمترین مقدار (۲/۸۴) و از نظر کیفی در طبقه عالی قرار دارد با سایر ایستگاه ها دارای اختلاف معنی داری بوده است ($P \leq 0.05$) و ایستگاه ۵ به عنوان آلوده ترین ایستگاه از بیشترین میزان در بین تمام ایستگاه ها برخوردار بوده که با سایر ایستگاه ها اختلاف معنی داری را نشان داد (به جز ایستگاه ۶) ($P \leq 0.05$)، همچنین بطور کل در فصل زمستان به مقدار این شاخص در ایستگاه های مطالعاتی جز ایستگاه ۴، نسبت به فصل پائیز افزوده شده که می تواند نشانگر توسعه انواع گونه های مقاوم (Chironomidae و Simuliidae) در این فصل باشد (شکل ۲-۳-۳-۱).

در بررسی حاضر متوسط دامنه تغییرات مقدار شاخص Shannon (H') در ایستگاه ۱ با ۲/۰۶ بیشترین میزان و ایستگاه های ۲ و ۶ به ترتیب با ۱/۳۴ و ۱/۳۸ کمترین میزان شاخص شانون را دارا بودند (شکل ۲-۳-۳-۲). روند تغییرات میانگین سالانه تنوع و شاخص زیستی HFBI در ایستگاه های مطالعاتی نشان داده که با افزایش تنوع میزان شاخص فوق کاهش می یابد (شکل ۳-۱۶). نتایج این شاخص ها نیز اثرات فعالیت های انسانی نظیر کارخانه چوب و کاغذ، کارگاه های پرورش ماهی و شن و ماسه را بر اکوسیستم رودخانه تجن نشان می دهد. نتایج همبستگی پیرسون بین شاخص های زیستی و متغیرهای فیزیکوشیمیایی ارتباط معنی داری را بین DO، TDS، EC، PO₄ و سرعت جریان آب نشان داد (جدول ۲-۳-۳-۳). همانطور که در جدول جدول ۲-۳-۳-۳ نشان داده شده که شاخص شانون همبستگی مثبتی با DO و EC و همبستگی منفی با TDS نشان داد.

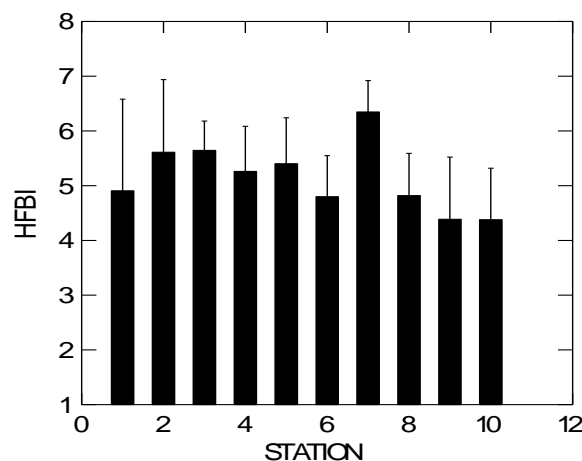
جدول ۲-۳-۳ همبستگی پیرسون بین شاخص‌های زیستی و پارامترهای فیزیکوشیمیایی

Water flow	DO	PO ₄	NH ₄	NO ₂	NO ₃	TDS	EC	pH	Indices
0.49**	-0.64**	0.46*	0.13	0.19	0.3	0.66**	0.64**	0.09	HFBI
-0.3	0.5**	-0.29	-0.2	-0.16	-0.21	-0.7**	0.6**	-0.17	H

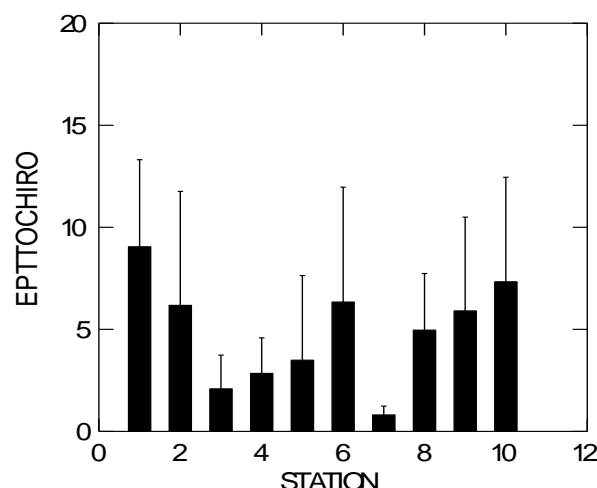
* معنی دار بودن همبستگی در سطح ۰/۰۵ ** معنی دار بودن همبستگی در سطح ۰/۰۱

به منظور بررسی دقیق تر میزان اثرات کارگاه‌های پرورش ماهی بر اکوسیستم رودخانه، نتایج مطالعه حاضر در رودخانه هراز نشان داد که شاخص EPT/CHIR در ایستگاه‌های بلافاصله بعد از هر مزرعه کمتر از قبل آنها بوده و با فاصله گرفتن از مزارع یک روند افزایشی نشان می‌داد (شکل ۳-۱۷)، به طوری که ایستگاه ۱ با ایستگاه‌های ۲ و ۳ و ایستگاه ۷ با ایستگاه‌های ۱ و ۶ در مقدار آن اختلاف معنی‌داری را نشان دادند.

مقادیر شاخص زیستی هیلسنهوف در ایستگاه‌های مطالعاتی در دامنه $۴/۹۱ \pm ۰/۹۴ - ۶/۵۵ \pm ۰/۴۹$ متغیر بود (شکل ۳-۱۸). براساس شاخص هیلسنهوف درجه آلودگی آلی و کیفیت آب در ایستگاه‌های مختلف در چهار طبقه کیفی خوب، مناسب، نسبتاً ضعیف و ضعیف قرار گرفتند. بر اساس شاخص فوق ایستگاه‌های ۳، ۵ و ۷ (ایستگاه‌های بلافاصله بعد از هر مزرعه) نسبت به ایستگاه‌های ۱، ۲، ۴ و ۶ (ایستگاه‌های قبل از هر مزرعه) آلوده تر به مواد آلی بودند. با فاصله گرفتن از مزارع پرورش ماهی (در ایستگاه‌های ۴، ۶ و ۸) از درجه آلودگی آلی کم شده و در طبقه با کیفیت آب بالاتر قرار گرفتند.

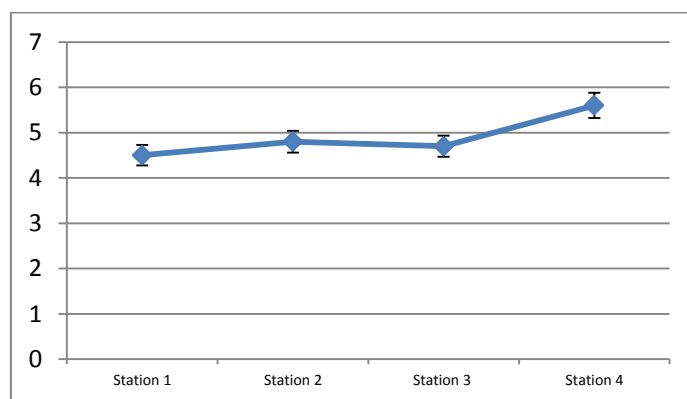


شکل ۲-۳-۳ تغییرات مقادیر شاخص HFBI در ایستگاه‌های مطالعاتی

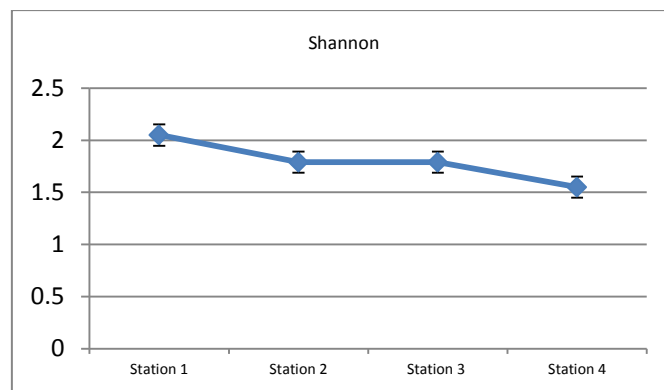


شکل ۲-۳-۱ تغییرات مقادیر EPT/CHIR. در ایستگاه‌های مطالعاتی

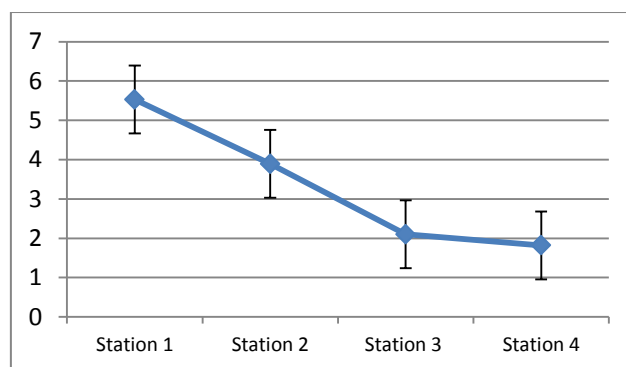
روند تغییرات مقادیر شاخص زیستی EPT/CHIR از بالادست رودخانه سردآبرود به پایین دست رودخانه کاهشی بوده، بطوری که حداکثر مقدار آن در ایستگاه ۱ (۵/۵۳) و حداقل آن در ایستگاه ۴ (۱/۸) بدست آمد (شکل ۲-۳-۱۹). مقدار این شاخص در ایستگاه بلافاصله بعد از پرورش ماهی (ایستگاه ۲) کمتر از قبل آن بدست آمد. به صورتی که مقادیر این شاخص در ایستگاه ۱ با ایستگاه ۲ و ایستگاه ۲ با ایستگاه‌های ۳ و ۴ اختلاف معنی داری را نشان دادند ($P < 0.05$) (شکل ۲-۳-۳). نوسانات شاخص شانس همانند شاخص زیستی EPT/CHIR، از بالادست رودخانه به پایین دست آن روند کاهشی داشت (شکل ۲-۳-۴). بررسی تغییرات شاخص HFBI نشان داد که حداقل این شاخص در ایستگاه ۱ (۴/۵) بوده و حداکثر آن در ایستگاه ۴ (۵/۶) بدست آمد (شکل ۲-۳-۵). روند تغییرات این شاخص نیز مطابق روند دو شاخص قبلی بوده و بر اساس شاخص هیلسنهوف اکوسیستم رودخانه سردآبرود در دو طبقه کیفی خوب و مناسب قرار گرفته که در مقایسه با دو رودخانه هراز و تجن از وضعیت کیفیت آب مطلوب تری برخوردار بود.



شکل ۲-۳-۵ تغییرات مقادیر شاخص HFBI



شکل ۲-۳-۴ تغییرات مقادیر شاخص شانون

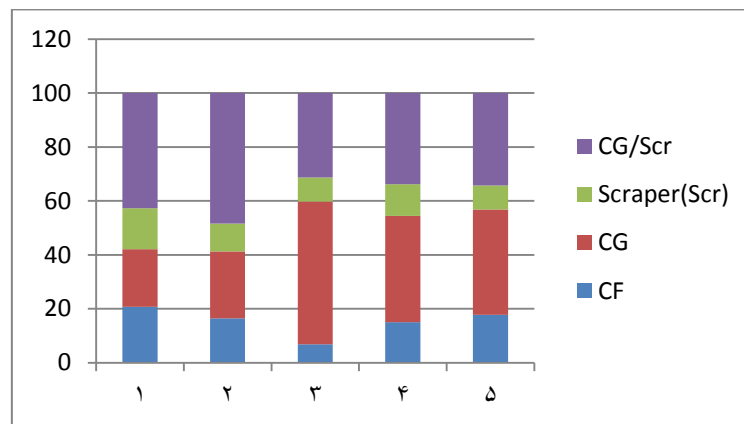


شکل ۲-۳-۳ تغییرات مقادیر شاخص EPT/CHIR

نتایج این مطالعه در رودخانه چالوس نشان داد که بزرگ بی مهرگان کفزی در این رودخانه شامل چندین گروه کارکرد تغذیه‌ای (FFG: Functional Feeding Group)، Scr (Scraper)، CG (Collector-Gatherer)، CG/Scr، CF، (Collector-Filterer) و Prd (Predator) می باشد. بیشترین فراوانی نسبی را در میان گروه‌های تغذیه‌ای به ترتیب گروه‌های CG، CG/Scr، CF و Scr در ایستگاه‌های مختلف دارا بودند.

در بررسی میانگین فراوانی سالیانه گروه‌های تغذیه در منطقه مورد مطالعه، بیشترین و کمترین فراوانی گروه تغذیه‌ای CG/Scr به ترتیب در ایستگاه ۱ و ۳ مشاهده شد. تغییرات این گروه در ایستگاه ۳ با سایر ایستگاه‌ها (به غیر از ایستگاه ۴) دارای اختلاف معنی داری بود ($P < 0.05$). گروه CG بیشترین و کمترین فراوانی را به ترتیب در ایستگاه ۵ و ۱ نشان داد (شکل ۲-۳-۶). فراوانی این گروه در ایستگاه ۱ و ۲ با سایر ایستگاه‌ها دارای اختلاف معنی داری بود ($P < 0.05$). روند تغییرات این گروه‌های کارکرد تغذیه‌ای و نوسانات برآیند تمامی شاخص‌های زیستی نشان داده شده در جدول ۲-۳-۴، نشان می دهد، اگرچه گاهی مقادیر این شاخص‌ها در طول مسیر رودخانه سینوسی بوده ولی در نهایت کیفیت آب و میزان تخریب زیستگاه رودخانه چالوس از

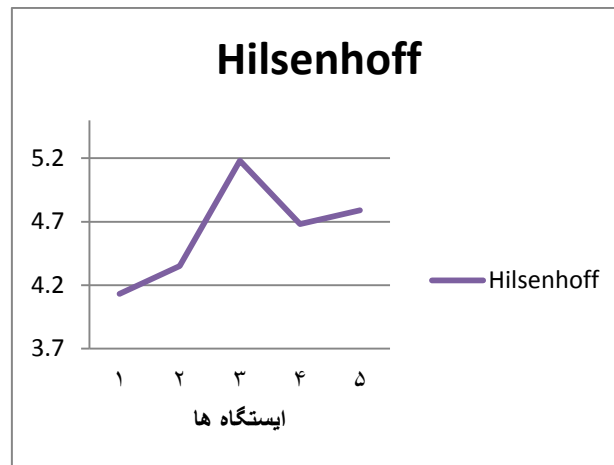
بالادست به پایین دست آن روند کاهشی دارد. این نتیجه با نتایج شاخص های شانن و هیلسنهوف که در شکل های ۲-۳-۳ و ۷-۳-۲ و ۸-۳-۳ نشان داده شده مطابقت داشته و برآیند همه این شاخص های زیستی بیان کننده تغییرات مختلف کیفی آب ناشی از انواع آلاینده ها در طول مسیر رودخانه چالوس بوده ، ولی در نهایت کیفیت آب اکوسیستم این رودخانه از بالادست به پایین دست کاهش معنی داری دارد.



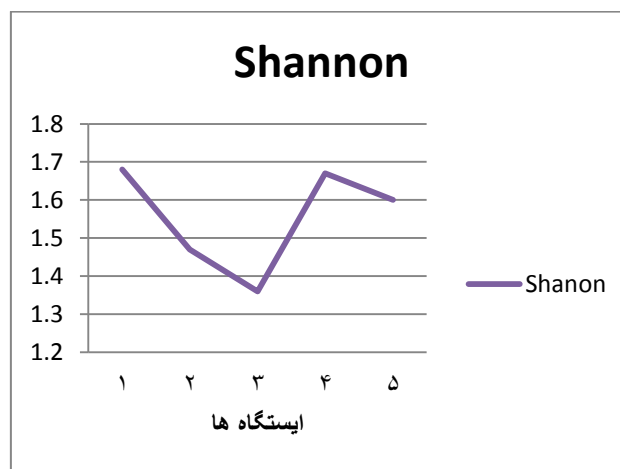
شکل ۲-۳-۶ ترکیب درصد فراوانی گروه های تغذیه ای ایستگاه های مختلف در رودخانه چالوس

جدول ۲-۳-۴ میانگین تغییرات فصلی برخی شاخص های زیستی

فصل	بهار			تابستان		
	EPT/CHIR	درصد EPT	غناي EPT	EPT/CHIR	درصد EPT	غناي EPT
ایستگاه						
1	4.2	76.1	5.4	4.2	77.2	7.5
2	3.5	70.6	5.2	5.3	77.7	5.5
3	1.6	52	3.2	1.9	57.3	3.7
4	2.4	60.8	4.6	4.4	71.7	5.7
5	2.5	63.5	4.5	3.6	70.6	4.5
فصل	پاییز			زمستان		
	EPT/CHIR	درصد EPT	غناي EPT	EPT/CHIR	درصد EPT	غناي EPT
ایستگاه						
1	3.3	72.1	5.2	4.4	80.3	2.7
2	2.5	68.4	4.4	31.9	89	3.7
3	1.1	35.7	2.7	0.6	33.7	2.4
4	1	39.5	3.3	2.6	66.3	3
5	1.4	42.6	3.5	2.9	63.6	3



شکل ۲-۳-۳ تغییرات شاخص هیلسنهوف در ایستگاه‌های رودخانه چالوس



شکل ۲-۳-۳ تغییرات شاخص شانن در ایستگاه‌های رودخانه چالوس

۳-۳-۳ - نتایج گونه‌های ماهیان

در مجموع در رودخانه‌های مورد مطالعه ۱۵ گونه ماهی شناسایی شده که ۶ گونه آنها غیر بومی بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که تمامی ماهیان شناسایی شده، گونه‌های ساکن رودخانه بوده و گونه‌های مهاجر از دریا به رودخانه صید نشدند. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فراوانی نسبی گونه‌های ماهی مقاوم به آلودگی ها و شرایط سخت محیطی در تمامی رودخانه‌ها بیشتر از گونه‌های حساس بودند (جدول ۳-۳-۳). در سد شهید رجایی ساری بیشترین فراوانی نسبی گونه‌های ماهیان به ترتیب متعلق به سیاه ماهی *Capoeta capoeta*، سس ماهی *Luciobarbus capito* و ماهی سفید رودخانه ای *Squalius cephalus* بودند. این گونه‌ها دارای ساختار سنی، طولی و وزنی مختلفی در زیستگاه سد فوق بوده، به عنوان مثال در نمونه‌های صید شده گونه *Luciobarbus capito* از اندازه سنی ۲ ساله تا اندازه سنی ۱۵ ساله بطول ۸۵ سانتی متر و وزن ۶/۵ کیلوگرم حضور داشتند. این گونه‌ها در فصل بهار به منظور تولید مثل مسافت کوتاهی را به بالادست رودخانه مهاجرت داخل رودخانه ای انجام داده

تا در محل مناسب از لحاظ نوع بستر، عمق و سرعت آب، دما و ... تخم‌ریزی نمایند. در این مطالعه در خرداد ماه نمونه‌های از سس ماهی *Luciobarbus capito* و ماهی سفید رودخانه ای در فاصله کمتر از ۵ کیلومتر در بالادست سد صید شده که کاملاً آماده تخم‌ریزی بودند. دمای آب در محل تولید مثل ۱۸ درجه سانتی گراد، عمق آب کمتر از ۲۰ سانتی متر، سرعت جریان آب ۰/۶ متر بر ثانیه و آب نسبتاً شفاف بود.

جدول ۳-۳-۱ گونه‌های ماهی شناسایی شده و فراوانی نسبی آنها در رودخانه‌های مورد مطالعه

چالوس	سردآبرود	هراز	تجن	نام گونه ماهی
۱۲۸	۲۵۲	۵۶	۹۸۳	<i>Alburnoides eichwaldi</i>
۲۵۶	۱۴۵	۹۸	۶۵۸	<i>Ponticola cyprius</i>
۲۶	۲۴	۳۰	۳۵۵	<i>Squalius cephalus</i>
۴۵۶	۳۵۶	۹۶	۱۶۳	<i>Capoeta capoeta</i>
۴۶	۳۹	۵۰	۶۰	<i>Barbus lacerta</i>
۲۲	۱۸	—	۵۳	<i>Luciobarbus capito</i>
۹	۵	—	۳۷	<i>Barbus mursa</i>
۱۹	۱۶	۲۵	۳۴	<i>Cobitis keyvani</i>
۶	۴	۱۷	۲۶	<i>Salmo trutta</i>
—	—	—	۲۲	<i>Cyprinus carpio</i>
۲۳	۱۲	۵۴	۱۷	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
—	—	—	۷	<i>Hypophthalmichthys olitrix</i>
۱۸	۱۵	۲۱	۶	<i>Pseudorasbora parva</i>
—	—	۱۲	۳	<i>Paracobitis malapterura</i>
۱۶	۱۱	۱۰	۳	<i>Carassius gibelio</i>
۵	۴	۲	۳	<i>Hemiculter leuciscus</i>

۴- بحث و نتیجه گیری

۴-۱- بانک ژن

۴-۱-۱- ماهی سفید

در مطالعه حاضر بیشترین هتروزیگوسیتی در ۰/۹۲ در نمونه های گیلان و کمترین آن در ۰/۲۲ مشاهده شده است. ضمن اینکه میانگین هتروزیگوسیتی در کل مناطق بین ۰/۵۵±۰/۰۳ برای جایگاه های مختلف بوده است. محاسبه ضرایب افت هتروزیگوسیتی نشان می‌دهد که در اکثر مناطق نمونه برداری و در تمامی جایگاهها (به غیر از CA1,2) کاهش هتروزیگوسیتی یا به عبارت دیگر بیشتر بودن مقادیر H_E نسبت به H_O وجود دارد. این نتایج نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی ماهی سفید در حوزه جنوبی دریای خزر کاهش یافته که یکی از دلایل اصلی آن از بین رفتن محل های تکثیر طبیعی و تکثیر مصنوعی این ماهی می باشد. در تکثیر مصنوعی به دلیل اینکه انتخاب طبیعی صورت نمیگیرد، سطح تنوع ژنتیکی کاهش می یابد. از دست دادن معنی دار تنوع ژنتیکی برای جمعیتها زیان بار بوده و بر میزان برداشت آنها تاثیر دارد. کاهش تنوع ژنتیکی در کوتاه مدت می تواند در اصلاح نژاد و پایین بودن سازگاری جمعیتی موثر باشد. این اثر در بلند مدت، بدلیل اینکه پتانسیل پاسخ به استرس در خزانه ژنی محدود می شود، برگشت پذیری جمعیت را کاهش می‌دهد (David et al., 2001). صید بیش از اندازه ماهیان دریایی باعث کاهش تنوع ژنتیکی گردیده و از دست دادن تنوع ژنهای کلیدی می‌تواند موجب کاهش ذخایر گردد (Slechtova et al., 2002). علاوه بر این کاهش تنوع ژنتیکی باعث می‌گردد که ماهیان در مبارزه با تغییرات شرایط اکولوژیکی ناتوان گردند.

عبدالحی و همکاران (۱۳۸۹) با استفاده از روش ریزماهواره، جمعیت ماهی سفید را در رودخانه های تجن، شیرو، سفیدرود و لمیر مورد مطالعه قرار دادند. آنان با استفاده از ۸ جایگاه ریزماهواره ای بیشترین هتروزیگوسیتی را (۰/۹۷) در رودخانه شیرو و کمترین آن را (۰/۱۷) در رودخانه تجن بدست آوردند. در مطالعه دیگری که توسط شجاعی (۱۳۸۸) انجام گرفت، مقدار هتروزیگوسیتی اندازه گیری شده در ماهی سفید حوزه جنوبی دریای خزر بین ۰/۰۹ تا ۱ بدست آمد که میانگین آن ۰/۵۲ بود. Thai و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی کپور معمولی در ویتنام، مقدار هتروزیگوسیتی را بین ۰/۴۰ تا ۰/۸۶ بدست آوردند. همچنین Li و همکاران هتروزیگوسیتی را در ماهی کپور معمولی بین ۰/۳۵ تا ۰/۸۰ محاسبه کردند.

Zhao و همکاران (۲۰۰۵) در ارزیابی تنوع ژنتیکی (*Acipenser sinensis*) با استفاده از روش ریز ماهواره ، مقدار هتروزیگوسیتی را ۰/۵۴ و متوسط تعداد الل در هرلوکوس را ۷ اندازه گیری نمودند. آنان علت کمبود هتروزیگوسیتی را اندازه کوچک جمعیت موثر ندانسته اند زیرا نمونه ها مربوط به ماهیانی بودند که قبل از ساخته شدن سد بر روی رودخانه یانگ تسه جمع آوری شده بودند و جمعیت به اندازه کافی بزرگ بود. در این مطالعه هوموزایگوسیتی بالا را احتمالا به وجود الهای صفر، تلاقی خویشاوندی (Inbreeding) و تقسیمات جمعیتی نسبت دادند.

Kitanishi و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه ساختار جمعیتی *Oncorhynchus masou* با استفاده از روش مایکروستلایت میزان هتروزایگوسیتی را $0.73 - 0.66$ با $23-6$ الل برآورد نمودند. Menezes و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه تنوع ژنتیکی *Katsuwonus pelamis* با استفاده از روش میزان هتروزایگوسیتی را $0.53 - 1$ با $30-7$ الل برآورد نمودند.

از دیگر مواردی که در این بررسی مورد مطالعه قرار گرفته، تعادل هاردی-واینبرگ می باشد. رابطه ای که پیش بینی های ژنوتیپی اخلاف را بر حسب فراوانیهای گامتی (اللی) خزانه ژن والدین بیان می کند، قانون هاردی-واینبرگ نامیده می شود. همانگونه که نتایج نشان داد کلیه نمونه ها به جز نمونه های گلستان و تجن در جایگاه *LOC4* و نمونه های منطقه گیلان در جایگاه *MF2* انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان دادند ($P < 0.05$). انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ دلایل متعددی می تواند داشته باشد. وجود جمعیت بزرگ با آمیزش اتفاقی (drift)، عدم انتخاب (selection)، عدم مهاجرت (gene flow)، عدم وجود فشار جهش و میوز معمولی در برقراری حالت تعادل موثر می باشند. Menezes و همکاران (۲۰۰۸) انحراف از تعادل مشاهده شده در جمعیت های *Katsuwonus pelamis* را به وجود الهای نول و اشتباهات الل خوانی و بالا بودن هتروزایگوسیتی در لوکوسهای میکروساتلایتی نسبت دادند. Kitanishi و همکاران (۲۰۰۷) انحراف از تعادل مشاهده شده در مطالعه ساختار جمعیتی *Oncorhynchus masou* را به خطای نمونه برداری نسبت دادند. Zhao و همکاران در سال (۲۰۰۵) در ارزیابی تنوع ژنتیکی (*Acipenser sinensis*) نیز انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را به وجود الهای صفر (null) و تلاقی خویشاوندی (Inbreeding) نسبت دادند.

Dahle و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی ترکیب ذخایر *Gadus morhua* انحراف در تعادل هاردی-واینبرگ را به علت افزایش هوموزایگوسیتی، آلل های نول، رانش ژنتیکی، انتخاب، مخلوط شدن و غیر کافی بودن نمونه ها می داند. Birgtte و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی جمعیت اردک ماهی (*Esox lucius*) انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در ۱۰٪ جمعیتها به ازای کل جایگاهها مشاهده کرد ($P < 0.05$, $P < 0.01$). ایشان این انحراف از تعادل را به اندازه کوچک جمعیت ناشی از حوادث بعد از عصر یخبندان نسبت دادند.

ساختار ژنتیکی جمعیتها به طور قابل ملاحظه ای بسته به رانش، جریان ژنی و مهاجرت همسو با حوادث تاریخی بلند مدت تغییر می کند. در بین آبریان، ماهیان دریایی تنوع ژنتیکی بالاتر و تمایز ژنتیکی پایین تری را نسبت به ماهیان آب شیرین نشان می دهند در حالی که ماهیان آب شیرین تنوع ژنتیکی پایین و تمایز ژنتیکی بالاتری را نسبت به ماهیان دریایی نشان میدهند. این تمایز به اندازه بزرگ جمعیت موثر و پتانسیل بالای جریان ژنی در محیطهای دریایی و اندازه کوچک جمعیت موثر و جریان ژنی محدود در جمعیت های آب شیرین نسبت داده می شود (Brigtte et al., 2005).

در برآورد ساختار ژنتیکی جمعیت باید از افراد متعلق به یک نسل نمونه برداری کرد. معمولاً موجوداتی که دوره زندگی طولانی دارند دارای هم پوشانی نسلی هستند بنابراین اطلاعات ژنتیک جمعیت، اغلب افراد را از

نسل‌های مختلف بررسی می‌کند. وقتی نمونه برداری در بیش از یک زمان صورت می‌گیرد راه ساده برای فقدان ساختار ژنتیکی موقتی تست تمایز بین نمونه‌هاست. مدل‌های مختلفی برای جهش پیشنهاد شده است، اما هیچ یک از مدل‌های ارائه شده به طور کامل مناسب برای جایگاه ریزماهواره‌ها نیستند. F_{ST} و R_{ST} به طور معمول در توصیف تمایز جمعیت در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی استفاده می‌شوند و هر یک مستقیماً و یا از میان ارتباط با تعداد مهاجرت موثر برآورد کننده تمایز هستند. هدف اصلی در حفاظت از ماهیان نگهداری دامنه وسیعی از تنوع ژنتیکی است. سازگاری و بقای گونه‌ها هنگامی حفظ می‌شود که تغییر پذیری ژنتیکی موجود از دست نرود (Meffe and Carool, 1997). در این بررسی نتایج نشان داده که حداکثر F_{ST} (۰/۰۲۳) بین نمونه‌های گرگانرود با سفیدرود و تجن می‌باشد. بر اساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه‌های گلستان با گیلان، گلستان با سفیدرود، گلستان با تجن، مازندران با سفیدرود و گیلان با تجن معنی دار بود ($P < ۰/۰۵$). علاوه بر این طبق محاسبات انجام شده اختلاف بین افراد هر منطقه ۲۲ درصد، داخل افراد ۷۷ درصد و بین جمعیت‌ها ۱ درصد بوده است. یکی از دلایل مقدار پائین F_{ST} در نمونه‌های مورد مطالعه، وجود جریانهای ژنی بین مناطق نمونه برداری شده، می‌باشد.

در مطالعه شجاعی و همکاران (۱۳۸۸) مقدار F_{ST} بین نمونه‌های ماهی سفید مناطق مختلف اختلاف معنی داری را با هم نشان دادند ($P < ۰/۰۱$) که حاکی از وجود جمعیت‌های متفاوت این گونه در جنوب دریای خزر و تفاوت آنها با جمعیت کورا است. بیشترین اختلاف ژنتیکی ($F_{ST} = ۰/۱۸۲$) بین نمونه‌های رودخانه کورا و نژاد پاییزه تالاب انزلی به دست آمد. عبدالحی و همکاران (۱۳۸۹) حداکثر F_{ST} را برای نمونه‌های ماهی سفید ۰/۰۱۷ و کمترین آن را ۰/۰۰۷ بدست آوردند. Beacham و همکاران (۲۰۰۴) در تعیین جمعیتی افراد *Oncorhynchus nerka* میزان F_{ST} را ۰/۰۶ تخمین زدند و ۸۹٪ از افراد مورد بررسی در دریاچه‌ها به یک دریاچه و ۹۶٪ افراد مورد بررسی در رودخانه‌ها به یکی از دو رودخانه تعلق داشتند. Charrier و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی ساختار ژنتیکی *Pollachius pollachius* ارتباط مثبتی میان مقدار F_{ST} و فاصله جغرافیایی را مشاهده نکردند و ساختار ژنتیکی ضعیف این ماهی را نشان دهنده جریان ژنی بالا بین مولدین اعلام کردند.

بطور کلی حفظ تنوع ژنی و ذخایر ژنتیکی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. نتایج بررسی‌ها نشان داده که متأسفانه در حال حاضر تنوع ژنتیکی ماهی سفید در حد پائین می‌باشد که این کاهش می‌تواند اثرات منفی بر ذخایر این گونه ارزشمند داشته باشد. وجود تنوع ژنوتیپی، شانس بقای جمعیت را افزایش می‌دهد. اگر شرایط محیط تغییر کند، ژنوتیپ‌های سازگار با شرایط جدید حفظ می‌شوند و ژنوتیپ‌های ناسازگار کاهش می‌یابند. بنابراین، تنوع ژنوتیپی باعث می‌شود که حداقل بعضی از افراد جمعیت در برابر تغییر شرایط محیط زنده بمانند. ولی از سوی دیگر، انتخاب طبیعی با گزینش افراد سازگارتر سبب می‌شود تا فراوانی ژنوتیپ‌های سازگارتر افزایش یابد.

۲-۱-۴- ماهی کلمه

ارزیابی و کنترل اکولوژی اکوسیستمهای آبی، به نشانگرهای اکولوژیکی نیاز دارد که در طیفی از معیارهای جهانی و جغرافیایی قابل تفسیر باشد. تنوع ژنتیکی بعنوان شاخص شرایط اکوسیستم و قابلیت برداشت منابع آبی می باشد که روشهای ژنتیک جمعیت قابل بررسی می باشد (Zhou et al., 2002). شناسایی گونه‌ها، زیر گونه‌ها و جمعیت‌های آبریان از اهمیت زیادی برخوردار است چرا که علاوه بر مدیریت صحیح و بهره برداری مناسب موجب اجرای برنامه‌های اصولی جهت حفاظت از گونه‌ها یا جمعیت‌های پر ارزش، بازسازی ذخایر و همچنین ایجاد تنوع در تکثیر و پرورش این موجودات خواهد شد. هدف مدیریت شیلاتی، ماکزیمم برداشت پایدار از ذخایر ماهیان می باشد که دستیابی به این هدف نیازمند آگاهی از ذخایر گونه‌ها و جمعیت‌ها می باشد. از جمله تکنیک‌های مولکولی رایج در تعیین تفاوت‌های نوکلئوتیدی، تشخیص جمعیت‌ها و پلی مورفیسم در بین جمعیت‌ها استفاده از ریزماهوره‌ها است. یک نشانگر ایده آل باید دارای جایگاههایی با تغییر پذیری بالا، قابلیت رتبه دهی و آلل‌های همباز بوده و به طور یکنواخت در سراسر ژنوم پخش شده باشد. ریزماهوره‌ها این خصوصیات را یک جا دارند و همین باعث شده تا در این مطالعه از این نشانگر استفاده شود. به علاوه سادگی تکنیک، هزینه نسبتاً کم، فراوانی و توزیع در سراسر ژنوم و چند شکلی بالا، از دیگر مزایای این نشانگر می باشد. در این مطالعه طبق جدول ۴-۳ از ۷ جفت پرایمر ریزماهوره‌ای استفاده شد که تمام آنها پلی مورف بودند. نتایج بدست آمده نشان داده که بیشترین تعداد آلل واقعی مربوط به نمونه‌های مازندران، گیلان، گرگانرود و خلیج گرگان (۹ آلل) و کمترین آن ۴ آلل بوده، ضمن اینکه حداکثر آلل موثر (۷/۵۸ آلل) در نمونه‌های خلیج گرگان و حداقل آن در مازندران (۲/۷۸ آلل) بوده است. علاوه بر این میانگین تعداد آلل‌های واقعی و موثر در بین تمامی نمونه‌ها بترتیب $5/75 \pm 0/30$ و $4/76 \pm 0/25$ بود. تعداد آللهای واقعی همان تعداد آللهای مشاهده شده برای یک جایگاه در یک جمعیت می باشد. از آنجاییکه این معیار اغلب به شدت تحت تاثیر اندازه نمونه قرار می گیرد، مقایسه بین جمعیت‌هایی که تعداد نمونه‌های آنها متفاوت می باشد، باید با احتیاط صورت گیرد.

تعداد آللهای موثر برابر $\frac{1}{F}$ می باشد که F نسبت هموزیگوت‌ها بوده و به عبارتی نسبت هموزیگوت‌ها معادل عکس تعداد آللهای موثر برای یک لوکوس در یک جمعیت خواهد بود. چون آللهای فراوانی یکسانی ندارند، تعداد آلل موثر از تعداد آلل واقعی کمتر است.

هتروزیگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در مطالعه ساختار جمعیت گونه‌ها دارد زیرا تامین کننده طیف وسیعی از ژنوتیپ به عنوان پاسخی به سازش پذیری در شرایط متغیر محیطی است و بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی مثل رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری را تحت تاثیر قرار می دهد. میکروستلایته‌ها شاخص حساسی در اندازه‌گیری هموزیگوسیتی در جفتگیری‌های همخون هستند بنابر این برای تشخیص تمایز کم بین جمعیت‌ها مناسب می باشند (Alarcon et al., 2004).

در مطالعه حاضر دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده بین مناطق نمونه برداری در جایگاههای هفت گانه بین ۰/۶۷-۰/۴۴ با میانگین ۰/۵۸ بود. همچنین دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار بین مناطق نمونه برداری در جایگاههای هفت گانه بین ۰/۷۴-۰/۷۲ با میانگین ۰/۷۳ بود. در این بررسی در تمامی مناطق نمونه برداری شده و در تمامی جایگاه ها هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار پایین تر بود. کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار نشان دهنده کاهش در تغییر پذیری ژنتیکی در نمونه ها است. از علل اصلی آن تنگناهای ژنتیکی بر اثر صید بی رویه، استرس های زیست محیطی، تخریب زیستگاه های طبیعی، کاهش تولید مثل در محیط طبیعی و آمیزش های خویشاوندی می باشد که با گذشت زمان موجب کاهش آلل و کاهش هتروزیگوسیتی در ذخایر می شود. در مطالعه ای که ریحانی (۱۳۸۹) با استفاده از ریزماهیواره ها بر روی ماهی کلمه انجام داد، سطح بالایی از تنوع (۰/۷) را در در مناطق مختلف اندازه گیری نمودند. در این بررسی تعداد آللهای مشاهده شده و موثر به ترتیب ۷/۲۵ و ۴/۸۵ بود. Laloei و همکاران (2013) در مطالعه ای بر روی ماهی کپور معمولی دریای خزر میانگین هتروزیگوسیتی قابل انتظار را بین ۰/۲۰ تا ۰/۹۲ محاسبه نموده و تعداد آلل موثر نیز ۱/۲۶ تا ۱۲/۲۵ بدست آمد. Cui و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی تنوع ژنتیکی *T. pseudommus* و *T. rubripes* در سواحل چین با استفاده از ۹ لوکوس میکروساتلایت توانستند سه جمعیت را از یکدیگر تفکیک نمایند. دامنه شاخص تنوع ژنتیکی در این ۹ لوکوس ۰/۶۴۶ تا ۰/۹۴۷ بود، شاخص تنوع ژنتیکی نشان می دهد که کاهش معنی داری بین جمعیت های پرورشی در مقایسه با جمعیت های وحشی دیده می شود. دلایل زیادی از جمله رانش ژنتیکی، اثر تنگناهای ژنتیکی، انتخاب طبیعی و مصنوعی و انتقال ذخایر برای کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت های پرورشی ذکر شده است.

در این مطالعه تعادل هاردی-واینبرگ در مناطق مختلف مورد بررسی، کلیه نمونه ها به جز نمونه های گلستان در جایگاه LOC3 انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان دادند ($P < 0/05$). Dahle و همکاران در سال ۲۰۰۶ در بررسی ترکیب ذخایر *Gadus morhua* انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را به علت افزایش هوموزایگوس، آلل های نول، رانش ژنتیکی، انتخاب، مخلوط شدن و غیر کافی بودن نمونه ها می داند. Lucentini و همکاران در سال ۲۰۰۶ علت انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را وجود جهش های محلی در پرایمرها که موجب نارسایی در تولیدات تکثیر شده و موجب طبقه بندی نادرست هتروزیگوتها همانند هوموزایگوتها می شود اعلام کردند. علاوه بر این Rico و همکاران در سال ۱۹۹۷ انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را به علت برون زاد آوری یا آمیزش غیر خویشاوندی اعلام نمودند. در بررسی حاضر در اکثر مناطقی که میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده پایین تر از هتروزیگوسیتی مورد انتظار بود عدم تعادل هاردی-واینبرگ مشاهده شد. چنین نتیجه ای می تواند ناشی از روش رتبه دهی به باندهای فریب دهنده یا وجود آلل های نول باشد که هوموزایگوس ها را جایگزین هتروزیگوس ها می کند. در واقع وجود آلل های نول در ماهیان پدیده ای معمول است. وجود عدم تعادل همراه با هتروزیگوسیتی بالا نشان دهنده وجود ساختار زیر جمعیت در منطقه نمونه برداری می باشد. فقدان کامل

انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در این مطالعه شاید به علت نمونه برداری در محدوده‌های زمانی متفاوت می باشد اما مهمترین دلیل وجود آلل‌های نول است که در بسیاری از مطالعات میکروستلایت گزارش می شود. همچنین رانش ژنتیکی، مخلوط شدن جمعیت‌ها، کافی نبودن نمونه‌ها، مهاجرت ماهیان مولد در بین مناطق نمونه برداری، آمیزش‌های خویشاوندی و وجود جهش‌های محلی در جایگاههای میکروستلایتی که موجب نارسایی در تولیدات تکثیر شده و موجب طبقه بندی نادرست هتروزیگوتها همانند هوموزیگوتها می شود را می توان از دلایل عدم تعادل هاردی-واینبرگ اعلام کرد.

از دیگر شاخص هائی که در بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار می گیرد، شاخص F_{ST} می باشد. نتایج بدست آمده از F_{ST} نشان داده که حداکثر آن (۰/۰۴) بین نمونه‌های گیلان با خلیج گرگان و حداقل F_{ST} (۰/۰۰۱) بین نمونه‌های خلیج گرگان با گلستان است. بر اساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه های گلستان با گیلان، گیلان با مازندران، گیلان با خلیج گرگان معنی دار بود ($P < 0.05$). در مطالعه ای که ریحانی (۱۳۸۹) بر روی ماهی کلمه دریای خزر انجام دادند، مقدار F_{ST} بین ۰/۱۰ تا ۰/۳۰ بود. ضمن اینکه نتایج بدست آمده از F_{ST} ، اختلاف معنی داری بین نمونه های بندرانزلی و خلیج گرگان نشان نداد ولی اختلاف نمونه های دلتای ولگا با بندرانزلی و خلیج گرگان معنی دار بود ($P < 0.01$). در نهایت با توجه به نتایج بدست آمده می توان عنوان نمود که نمونه های ماهی کلمه دریای خزر مربوط به یک جمعیت نبوده و از گروه های ژنتیکی متفاوتی تشکیل شده است که در برنامه های مدیریت شیلاتی و تکثیر این ماهی باید مد نظر قرار گیرد.

۳-۱-۴- ماهی آزاد

کاهش ذخایر آبزیان در بسیاری از نقاط جهان باعث شده تا محققین علوم شیلاتی جهت مدیریت ذخایر آبزیان قبل از هر اقدام عملی، به مطالعه و تعیین ساختار ژنتیکی گونه های با ارزش آن منطقه از طریق روشهای مولکولی روی آورند. این مطالعات در برنامه های بهره برداری از ذخایر آبزیان دریایی، صنعت آبرزی پروری و برنامه های اصلاح نژاد دارای اهمیت زیادی می باشد. در سالهای اخیر، روند آسیب پذیری آبزیان دریای خزر به علت برداشت بی رویه، ورود آلودگی های گوناگون و ...، لزوم اجرای مطالعات بنیادی و کاربردی، جهت اطلاع از جمعیت یا جمعیت‌های احتمالی، طرح برنامه های حمایتی و حفاظتی مثل تکثیر و پرورش، مدیریت ذخایر و ارائه الگوی پایدار صید و برداشت را ضروری نموده و اهمیت این موضوع فقط به منظور بهره برداری از منابع شیلاتی نیست بلکه جهت حصول اطمینان از تنوع زیستی و حفظ عملکرد اکولوژیک اکوسیستم های دریایی نیز می باشد. تنوع ژنتیکی یکی از سه سطح تنوع زیستی پیشنهاد شده توسط اتحادیه بین المللی حفاظت از گونه ها و طبیعت برای برنامه های حفاظت از ذخایر است (Lucentini et al., 2006). در صورتی که این استراتژی بر پایه ی روشهای دقیق و قوی مثل داده های مولکولی باشد، می تواند علاوه بر حفظ تنوع زیستی، میزان برداشت و بهره

برداری را به حد معقول و حداکثر برساند (Thai et al., 2006). نخستین گام جهت حفاظت از ساختار ژنتیکی و تنوع زیستی جمعیت‌های در حال بهره برداری آبزیان، تدوین استراتژی مدیریت برداشت پایدار است. در مطالعه حاضر ساختار ژنتیکی ماهی آزاد دریای خزر با استفاده از روش توالی یابی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه، بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده ($0/67$) در رودخانه چالوس و کمترین آن در رودخانه تنکابن ($0/62$) بوده است. ضمن که میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بین تمامی نمونه‌ها بترتیب $0/61 \pm 0/35$ و $0/12 \pm 0/33$ بود. علاوه بر این بیشترین تنوع هاپلوتایپی ($0/89 \pm 0/04$) مربوط به رودخانه سردآبرود بوده و کمترین آن در نمونه‌های آستارا مشاهده شده است ($0/81 \pm 0/02$). علاوه بر این بیشترین تنوع نوکلئوتیدی $0/07 \pm 0/13$ در رودخانه‌های سردآبرود و چالوس و کمترین آن $0/06 \pm 0/11$ در رودخانه تنکابن مشاهده شده است. بطور کلی نتایج نشان داده که تنوع ژنتیکی در ماهی آزاد دریای خزر در سطح پائینی می باشد. در مطالعه ای که توسط نجار لشکری (۱۳۹۲) انجام گرفت، میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در سه رودخانه چالوس، سردآبرود و آستارا $0/03 \pm 0/10$ و بیشترین میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار ($0/14 \pm 0/37$) در رودخانه سردآبرود و کمترین میانگین آن ($0/14 \pm 0/31$) در رودخانه ی چالوس بدست آمد.

برای تعیین میزان اختلاف ژنتیکی کل موجود در یک زیر جمعیت و مقایسه آن با اختلاف ژنتیکی کل در بین مناطق هر ناحیه از فاکتور FST استفاده می شود. حداکثر آن ($0/08$) بین نمونه‌های چالوس با کرگانرود و تنکابن با کرگانرود و حداقل FST ($0/01$) بین نمونه‌های کرگانرود با آستارا مشاهده شده است. طبق نظریه Dorak (2005) تمایز ژنتیکی بین مناطق نمونه برداری ماهی آزاد در محدوده متوسط به بالا می باشد. FST بیشتر شامل اندازه گیری تمایز در زیر جمعیتها است و بیشترین کاربرد را در آزمون واگرایی ژنتیکی در بین زیر جمعیتها دارد و مقدار آن همیشه مثبت بوده و بین عدد صفر (هیچ جمعیتی وجود ندارد) و یک (وجود جمعیت و جدایی کامل جمعیتها) متغیر است. وجود اختلاف ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های گونه‌های مختلف، تحت تأثیر عوامل مختلفی چون تاریخچه مشترک، جدایی جغرافیایی، جریان ژنی حال و گذشته و همینطور فرآیندهای مختص جمعیت، مانند رانش ژنتیکی و انتخاب انطباقی قرار دارد (Dorak, 2005; Li et al., 2007). Vera و همکاران (2011)، در مطالعه ی ساختار ژنتیکی مولدین ماهی آزاد دریای خزر (رودخانه‌های کرگانرود، ناورود، تنکابن و سردآبرود) که با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر ریز ماهواره انجام گرفت، میزان اختلاف ژنتیکی را $0/05$ به دست آوردند. همچنین در بررسی که توسط نجار لشکری (۱۳۹۲) انجام گرفت، مقدار FST بین نمونه‌های ماهی آزاد رودخانه چالوس و سردآبرود ($0/03$)، چالوس و آستارا ($0/06$) و سردآبرود و آستارا ($0/01$) بود و میزان شاخص جریان ژنی نیز در رودخانه‌های مورد مطالعه ($2/78$) به دست آمد. به طور معمول مقدار FST زیر $0/05$ مطرح می شود و محققین ممکن است ساختار بین زیر جمعیتها را ضعیف تفسیر کنند، در حالیکه این مطلب

نمایانگر همه جمعیت حقیقی نیست. نکته دیگر اینکه میزان FST در اکثریت موارد به یک نمی‌رسد زیرا اثر پلی مورفیسم ناشی از جهش به طور موثری میزان FST را تغییر می‌دهد (Charlesworth, 1998; Hedrick, 1999). میزان اختلاف های نوکلئوتیدی در هر توالی به صورت فاصله ی ژنتیکی تخمین زده می شود. بنابراین بسته به میزان تفاوت نوکلئوتیدها در هر توالی، اختلاف های درون گونه ای و بین گونه ای مشخص می شود. این عامل به طور مستقیم یا از طریق ارتباط با مهاجرت مؤثر، برآورد کننده ی تمایز ژنتیکی است. در مطالعه حاضر بیشترین فاصله ژنتیکی ۰/۱۲ بین رودخانه های گرگانرود و چالوس و کمترین آن ۰/۰۹ بین رودخانه سردابرو و تنکابن می باشد. بطور کلی فاصله ژنتیکی بین نمونه های جمع آوری شده از مقدار کمی برخوردار بوده است. بر اساس مطالعات نجارلشکری (۱۳۹۲) بیشترین فاصله ی ژنتیکی و کمترین شباهت ژنتیکی بین رودخانه های چالوس و آستارا و کمترین فاصله ی ژنتیکی و بیشترین شباهت ژنتیکی بین رودخانه های سردابرو و آستارا مشاهده شد. در مطالعات Vera و همکاران (2011)، که با استفاده از روش توالی یابی mtDNA انجام گرفته، میانگین فاصله ی ژنتیکی مولدین ماهی آزاد دریای خزر ۰/۲۲ ($P < 0.001$) محاسبه گردید که بر اساس نظریه Thorpe و همکاران (1994)، در محدوده ی گونه های هم جنس (۰/۰۳-۰/۶۱) قرار می گیرد و با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

نتیجه گیری کلی: نتایج حاصل از مطالعه حاضر بر روی پنج رودخانه مهم شیلاتی در شمال کشور نشان داد که جمعیت یکسانی از ماهی آزاد در این رودخانه ها وجود نداشته و گروه های ژنتیکی متفاوتی زیست می نمایند. بر اساس نتایج بدست آمده سه گروه ژنتیکی متفاوت از این گونه در رودخانه های مورد مطالعه تشخیص داده شد.

۴-۱-۴- سس ماهی

سس ماهی دیگر ماهی نادر و با ارزش دریای خزر است که هم اکنون به دلیل کاهش جمعیت آن در دریا اهمیت شیلاتی آن از بین رفته است ولی از لحاظ حفظ ذخایر ژنتیکی نیاز به برنامه ریزی و حمایت دارد. نمودار صید سس ماهی در دریای خزر بسیار ناهموار و تغییرات زیادی را نشان می دهد. این ماهی در یک دهه بین ۱۳۰۰ تا ۱۳۱۰ میزان بسیار کمی از این ماهی را پره صیادان صید پره نشان داده است. به یکباره و به دلایل نامشخص در طی ۵ سال پس از آن صید آن افزایش چشمگیری داشته و در سال ۱۳۱۱ بیش از ۲۵ تن رسید. پس از آن دوره، رکود صید این ماهی فرا رسید و تا سال ۱۳۱۹ مجدداً ماهی قابل ملاحظه ای صید نگردید. از این سال به بعد با افزایش و کاهش صید مواجه بوده بطوریکه میزان صید عمدتاً در حدود ۱۵ - ۱۰ تن و در سالهای ۱۳۴۵ و ۱۳۴۸ به بیش از ۵۰ تن نیز رسید و در سال ۱۳۷۹ میزان آن مجدداً به کمترین میزان خود رسید. در حال حاضر ذخایر این ماهی به شدت کاهش یافته، بطوری که بسختی می توان آن را مشاهده نمود.

در مطالعه حاضر ساختار ژنتیکی سس ماهی خزر با استفاده از روش توالی یابی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه، بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در رودخانه سفیدرود و کمترین آن در استان گیلان بوده است. ضمن اینکه میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بین تمامی نمونه‌ها بترتیب 0.003 ± 0.035 و 0.042 ± 0.12 بود. علاوه بر این بیشترین تنوع هاپلوتایپی مربوط به منطقه گیلان بوده و کمترین آن در نمونه‌های منطقه مازندران مشاهده شده است. همچنین بیشترین تنوع نوکلئوتیدی در نمونه‌های سفیدرود و کمترین آن در رودخانه نجن مشاهده شده است. بطور کلی نتایج نشان داده که تنوع ژنتیکی در سس ماهی در سطح پائینی می باشد.

برای تعیین میزان اختلاف ژنتیکی کل موجود در یک زیر جمعیت و مقایسه آن با اختلاف ژنتیکی کل در بین مناطق هر ناحیه از فاکتور FST استفاده می‌شود. در این بررسی حداکثر مقدار FST (0.04) بین نمونه‌های رودخانه نجن با سفیدرود و حداقل آن بین نمونه‌های نجن با مازندران مشاهده شده است. طبق نظریه Dorak (2005) تمایز ژنتیکی بین مناطق نمونه برداری ماهی آزاد در محدوده متوسط به بالا می باشد.

میزان اختلاف‌های نوکلئوتیدی در هر توالی به صورت فاصله ی ژنتیکی تخمین زده می شود. بنابراین بسته به میزان تفاوت نوکلئوتیدها در هر توالی، اختلاف‌های درون گونه ای و بین گونه ای مشخص می شود. این عامل به طور مستقیم یا از طریق ارتباط با مهاجرت مؤثر، برآورد کننده ی تمایز ژنتیکی است. در مطالعه حاضر بیشترین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های رودخانه سفیدرود و نمونه‌های منطقه مازندران و کمترین آن بین نمونه‌های منطقه مازندران و رودخانه نجن می باشد. بطور کلی فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های جمع آوری شده از مقدار کمی برخوردار بوده است.

Berrebi و Kotlik (۲۰۰۲) روابط فیلوژنی ماهی *Barbus Potenyi* با استفاده از توالی یابی ژن سیتوکروم b درنواحی از رودخانه دانوب را مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی ۱۷ هاپلوتیپ متفاوت در ۳ منطقه از رودخانه شناسایی شد. تنوع هاپلوتیپی بین 0.15 تا 0.75 و تنوع نوکلئیدی بین 0.003 تا 0.116 متغیر بود.

Markova و همکاران (۲۰۱۰) تنوع ژنتیکی *Barbus Prespensis* و *B. rebeli* را با استفاده از توالی نوکلئوتیدی mt DNA درنواحی از آلبانیا و یونان مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق تنوع هاپلوتیپی بین 0.743 تا 0.961 و تنوع نوکلئوتیدی بین 0.002 تا 0.052 محاسبه گردید. ضمن اینکه تعداد ۱۲ هاپلوتیپ نیز مشاهده گردید.

Berrebi و Kotlik (۲۰۰۲) تنوع ژنتیکی *Barbus petenyi* را با استفاده از توالی یابی DNA میتوکندری درنواحی شرقی و جنوبی اروپا مورد مطالعه قرار دادند. در این بررسی تعداد ۲۰ هاپلوتیپ شناسایی گردید. تنوع هاپلوتیپی بین 0.15 تا 0.75 و تنوع نوکلئیدی بین 0.003 تا 0.116 بدست آمد. ضمن اینکه حداکثر اختلاف بین نوکلئوتیدی $3/5$ درصد بود.

۵-۱-۴- ماهی سوف

تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از سه عامل ضروری حفاظت از گونه ها بیان شده است (Miller, 1997). مدیریت ذخایر در صورتیکه برپایه اطلاعات دقیق از قبیل مطالعات مولکولی باشد، بهتر می تواند علاوه بر حفظ تنوع زیستی، میزان برداشت و بهره برداری را به حد معقول و حداکثر برساند (Murgia et al., 2002). شناسایی تحولات درون گونه ای و ساختار جمعیت یکی از نیازهای اساسی در اعمال مدیریت صحیح بهره برداری می باشد. بررسی ساختار ژنتیکی و مطالعات جمعیتی ماهی سوف از پیشینه مطالعاتی برخوردار نمی باشد.

یکی از روشهای قابل اعتماد بررسی ساختار ژنتیکی استفاده از ریزماهواره ها می باشد. به خاطر تنوع بالای این جایگاه ها، از آنها برای مطالعه روابط تکاملی گونه های نزدیک به هم استفاده می کنند. هرچند در استفاده و کارآمد بودن آنها نیز مسائلی از قبیل مقیاس اندازه گیری برای مسافت ژنتیکی در طراحی و

محاسبه درخت فیلوژنی، تعداد جایگاه های مورد نیاز و تعداد جایگاه برای هر نمونه (Chistiakov et al., 2006). بیشتر مطالعات فیلوژنی که توسط ریزماهواره ها انجام شده است برای روابط زیرگونه یا برای گونه های انشقاق یافته بوده است. مناطق مجاور توالی تکراری که پرایمر بر اساس آن ساخته می شود فوق العاده حفظ شده است، به همین خاطر از آن برای روابط فیلوژنی استفاده می شود. برای مثال در مطالعات فیلوژنی انجام شده روی ماهیان سیچلاید براساس اطلاعات حاصل از توالی DNA مناطق مجاور جایگاه ریزماهواره حفاظت بالایی در چندین نسل از این ماهی مشاهده شد که انشقاق آن مربوط به ۸۰ تا ۱۰۰ میلیون سال پیش بود (Zardova et al., 1996). در اینگونه بررسی ها تعداد نمونه بسته به هدف آزمایش متفاوت می باشد. بر خلاف بررسی های ساختار جمعیتی که نیاز به یک نمونه برداری وسیع در سطح منطقه است، در مطالعات جمعیتی تعداد مارکر کم و تعداد نمونه برداری زیاد ولی در مطالعات فیلوژنی تعداد مارکر زیاد و نمونه ها را کم در نظر میگیرند (Olivares et al., 2008).

در این مطالعه، هر ۷ جفت پرایمر ریزماهواره ای استفاده شده پلی مورف بودند. نتایج بدست آمده نشان داده که بیشترین تعداد آلل واقعی مربوط به نمونه های مازندران و گلستان (۹ آلل) و کمترین آن ۳ آلل بوده، ضمن اینکه حداکثر آلل موثر (۶/۸۷ آلل) در نمونه های گلستان و حداقل آن در مازندران (۰/۹۶ آلل) بوده است. علاوه بر این میانگین تعداد آلل های واقعی و موثر در بین تمامی نمونه ها بترتیب $6/14 \pm 0/45$ و $3/88 \pm 0/34$ بود. تعداد آللهای واقعی همان تعداد آللهای مشاهده شده برای یک جایگاه در یک جمعیت می باشد. از آنجائیکه این معیار اغلب به شدت تحت تاثیر اندازه نمونه قرار می گیرد، مقایسه بین جمعیت هایی که تعداد نمونه های آنها متفاوت می باشد، باید با احتیاط صورت گیرد.

همچنین در مطالعه حاضر دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده بین مناطق نمونه برداری در جایگاههای هفت گانه بین ۰/۲۳-۰/۸۷ با میانگین ۰/۲ بود. همچنین دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار بین مناطق نمونه برداری در جایگاههای هفت گانه بین ۰/۴۰-۰/۸۵ با میانگین ۰/۷۳ بود. در این بررسی در تمامی مناطق نمونه برداری شده و در تمامی جایگاه ها هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار پایین تر بود. کاهش

هتروزایگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزایگوسیتی قابل انتظار نشان دهنده کاهش در تغییر پذیری ژنتیکی در نمونه‌ها است. از علل اصلی آن تنگناهای ژنتیکی بر اثر صید بی رویه، استرس‌های زیست محیطی، تخریب زیستگاه‌های طبیعی، کاهش تولید مثل در محیط طبیعی و آمیزش‌های خویشاوندی می‌باشد که با گذشت زمان موجب کاهش آلل و کاهش هتروزایگوسیتی در ذخایر می‌شود. علاوه بر این در این بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در مناطق مختلف مورد بررسی، اکثر نمونه‌ها در جایگاه‌های PflaL6، PflaL7 و PflaL8 انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ ($P < 0.05$) را نشان دادند. Lucentini و همکاران در سال ۲۰۰۶ علت انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را وجود جهش‌های محلی در پرایمرها که موجب نارسایی در تولیدات تکثیرشده و موجب طبقه بندی نادرست هتروزایگوتها همانند هوموزایگوتها می‌شود اعلام کردند. علاوه بر این Rico و همکاران در سال ۱۹۹۷ انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را به علت برون زاد آوری یا آمیزش غیر خویشاوندی اعلام نمودند. از دیگر شاخص‌هایی که در بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد، شاخص FST می‌باشد. نتایج بدست آمده از FST نشان داده که حداکثر آن (۰/۳۳) بین نمونه‌های گیلان با مازندران و حداقل FST (۰/۰۱۴) بین نمونه‌های گیلان با گلستان است. بر اساس آنالیز انجام شده اختلاف بین نمونه‌های گیلان با مازندران و گلستان با مازندران معنی دار بود ($P < 0.05$).

Sepulveda و همکاران (۲۰۰۹) تنوع ژنتیکی ماهی سوف حاجی طرخان (*Perca Plavescens*) را با روش تعیین توالی DNA میتوکندری در دریاچه می‌سی‌سی‌پی مورد مطالعه قرار دادند. آنها ۲۱ هاپلوטיפ را شناسایی نمودند که بر اساس آنالیزهای انجام شده، اختلاف معنی داری بین هاپلوטיפ‌ها مشاهده شد. در این بررسی اختلاف بین هاپلویت‌ها ۰/۰۷ بود.

در مطالعه دیگری Brown و همکاران (۲۰۰۷) تنوع ژنتیکی این ماهی را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در شمال آمریکا (کارولینای شمالی و میسیگان) مورد مطالعه قرار دادند. در این بررسی ۲۲۳ آلل شناسایی شد که میزان فراوانی ۳۷٪ از آلل‌ها حدود ۵٪ بود. در این بررسی هتروزایگوسیتی مورد انتظار ۰/۰۴ تا ۰/۸۸ بوده و اختلاف ژنتیکی در حد بالایی معنی دار بود. میزان FST در این مطالعه بین ۰/۰۵۲ تا ۰/۴۴۵ متغیر بود.

بطور کلی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها بطور مداوم در حال تغییر و تحول می‌باشد که این تغییر بستگی به میزان تولید مثل بین جمعیت‌ها دارد. جمعیت مرکز تکثیر که از لحاظ اندازه کوچکتر از جمعیت رودخانه می‌باشند، بزرگترین عامل تغییر ساختار ژنتیکی نسبت به جمعیت رودخانه‌هاست. کاهش اختلاف ژنتیکی از طریق آمیزش خویشاوندی و رانش ژنتیکی در بین جمعیت‌های مراکز بازسازی ذخایر امری متداول می‌باشد. به نظر می‌رسد فقدان تنوع ژنتیکی عامل کاهش پتانسیل ژنتیکی در اصلاح ذخایر و سازگاری جمعیت‌ها به تغییرات محیطی باشد. بنابراین پایش و مطالعه هرگونه تغییر در ساختار ژنتیکی جمعیت مراکز تکثیر و بازسازی ذخایر و نیز جمعیت رودخانه‌های محل مهاجرت و تخم‌ریزی ضروری به نظر می‌رسد (Alam & Islam, 2005). زمانیکه یک گونه خاص از ماهیان قرار است به عنوان یک منبع حیاتی مدیریت شود توانایی ارزیابی ژنتیکی و دسترسی به

ساختار ژنتیکی جمعیت آنها می تواند بعنوان ابزاری بسیار مهم در حفظ تولیدات شیلاتی آنها بکار گرفته شود (Seeb et al., 1990). بنابراین اطلاع و آگاهی از ساختار ژنتیکی و جمعیتی ماهی سوف در سواحل جنوبی دریای خزر قبل از هر گونه اقدام عملی در راستای ازدیاد ذخایر آن ضروری به نظر می رسد.

۲-۴- انجماد اسپرم

کیفیت اسپرم منجمد شده بستگی به عوامل مختلفی دارد که در درجه اول مرتبط به خود مایع منی (درجه رسیدگی جنسی و کیفیت اولیه اسپرم) و در درجه دوم مرتبط به فاکتورهای دخیل در روند انجماد (تغییر دامنه حرارتی، رقیق کننده و مواد محافظ از سرما) هستند. از مهمترین عوامل در این مسیر باید به رقیق کننده ها اشاره نمود. در این بررسی در هر دو ماهی از رقیق کننده ای برپایه گلوکز استفاده شد. از رقیق کننده های برپایه گلوکز در بسیاری از ماهیان مانند کپور معمولی، گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) و ماهی آزاد دریای خزر بطور موفقیت آمیزی استفاده شده است. موفقیت رقیق کننده بر پایه گلوکز را میتوان به نقش آنها به عنوان یک ماده خوب محافظ سرما و نیز کمک کننده به حفظ پایداری غشا اسپرم نسبت داد (Sarvi et al., 2006). در این بررسی در ماده رقیق کننده اسپرم ماهی آزاد از متانول و زرده تخم مرغ استفاده شد. گزارش شده است که زرده تخم مرغ پوششی در سطح دیواره سلولی اسپرم ایجاد میکند و به این ترتیب موجب کاهش لیز سلولی طی فرآیند انجماد میگردد. عملکرد اختصاصی زرده تخم مرغ کاملاً مشخص نشده است لیکن عنوان شده که این ماده واجد لیوپروتئینی با دانسیته کم است که به غشا سلول اسپرم می چسبد و یا واجد چربیهای است که اسپرم را در ترمیم دیواره آسیب دیده اش کمک میکند. اما این تاثیر زرده تخم مرغ بسیار اختصاصی است و در همه گونه های آزاد ماهیان به یک میزان تاثیر بر کیفیت اسپرم ندارد. متانول متداول ترین محافظ سرمایی است که در بسیاری از گونه های آزاد ماهیان بطور موفقیت آمیزی مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات نشان داده استفاده از متانول اثرات سمی بسیار اندکی در مقایسه با دی متیل سولفوکساید (DMSO) بر اسپرم دارد و در مقایسه با DMSO، اسپرمهای رقیق شده با متانول بطور معنی داری قابلیت تحرک و باروری بیشتری داشته اند. این امر شاید مربوط به کم نمودن آب سلول توسط متانول باشد که به این ترتیب موجب افزایش مقاومت سلول اسپرم در برابر انجماد میگردد (Jodun et al, 2006).

در این مطالعه مشخص شد نمونه های اسپرم ماهی سفید که با پلی اتیلن گلی کول رقیق شده بودند همگی از بین رفتند در حالیکه نمونه هایی که با گلیسرول رقیق شده بودند زنده ماندند. مطالعات نشان داده است که گلیسرول یکی از نفوذپذیرترین ترکیبات محافظ سرما به داخل سلول با کمترین تاثیر سمی است. بدلیل نفوذ عالی که این ماده به داخل سلول دارد موجب پایداری دیواره سلولی شده و نیز ممانعت از تشکیل کریستالهای یخ در سیتوپلاسم اسپرم به عمل می آورد (Yavas and Bozkurt, 2011).

آنچه که در این بررسی برای القا تحرک در اسپرم ماهیان از آب رودخانه در نمونه های تازه و از محلول ۰/۳٪ NaCl در بعد از مرحله خارج شدن از انجماد استفاده شد. اصولاً تحرک اسپرم خارج از ساختار اندام تولید مثلی (بیضه‌ها) با استفاده از محلول ممانعت کننده از تحرک که فشار اسمزی مشابه مایع سمینال دارد صورت می‌گیرد (Billard et al. 1995). مطالعات نشان داده است که فشار اسمزی مایع سمینال در ماهیان آب شیرین و یا رودکوچ $230 - 346 \text{ OsmKg}^{-1}$ است (Alavi and Cosson, 2006). بنابراین جهت تحریک اسپرم در این گروه از ماهیان نیاز به ایجاد یک شوک هیپواسموتیک است یا در آزاد ماهیان این کار را با کاهش غلظت یون پتاسیم انجام می‌دهند. بنابراین استفاده از آب رودخانه و یا محلول ۰/۳٪ NaCl که فشار اسمزی در حد 96 OsmKg^{-1} دارد و یک محلول هیپواسموتیک است میتواند به عنوان بهترین محیط فعال سازی جهت اسپرم تازه و یا ایجاد تحرک در اسپرمی که از انجماد خارج شده است استفاده نمود (Nahidozzaman et al. 2012).

در این بررسی از دو روش دستی و اتوماتیک (استفاده از دستگاه) برای منجمد نمودن نمونه‌ها استفاده گردید. در روش دستی دامنه کاهش حرارت در اسپرم ماهی آزاد $30^\circ\text{C min}^{-1}$ بود در حالیکه در روش اتوماتیک (با استفاده از دستگاه) که برای نمونه ماهی سفید استفاده شد، دامنه کاهش درجه حرارت از ۴ تا ۲۰- درجه سانتیگراد 5 min^{-1} و از ۲۰- تا ۴۰- درجه سانتیگراد این دامنه $10^\circ\text{C min}^{-1}$ بود. مطالعات نشان داده است که مهمترین مرحله در روند انجماد، حرارتهای بیشتر از ۴۰- درجه سانتیگراد است. زیرا معمولاً ایجاد کریستالهای یخ در این مرحله صورت می‌گیرد و زمانی که دمای نمونه به به ۴۰- درجه سانتیگراد رسید، می‌توان سلولها را بدون کمترین آسیب در ازت مایع قرار داد. اصولاً موفقیت یک روند مناسب کاهش دما بستگی به عوامل مختلفی مانند نوع سلول، سایز سلول، ترکیب غشا سلولی، نوع ماده محافظ از سرما و غلظت آن، مدت زمان هم دما سازی و تداخلات بین این فاکتورها دارد (Yao et al. 2000). به غیر از تاثیر تغییرات دمایی در زمان انجام روند انجماد، نحوه خارج نمودن نمونه ها از انجماد نیز عامل موثر دیگری بر ماندگاری سلولهای اسپرم است. در این بررسی برای خارج نمودن نمونه اسپرم ماهی آزاد از انجماد از حمام آب با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و برای از انجماد خارج نمودن نمونه های اسپرم ماهی سفید از حمام آب با دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه استفاده گردید.

مطالعات نشان داده است که بهترین دما برای ذوب اسپرم منجمد شده آزاد ماهیان حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد در مدت ۳۰ ثانیه است و در این حالت نمونه اسپرم در مقایسه با نمونه ای که در حرارت ۳۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۲۵ ثانیه قرار گرفته است بطور معنی داری میزان تحرک و لقاح آن بیشتر بوده است (Lahnsteiner 2000). براساس مطالعات مشخص شده که موفقیت آمیز بودن نتیجه از انجماد خارج نمودن اسپرم کپور ماهیان با استفاده از دامنه حرارتی ۴۰ - ۳۰ درجه سانتیگراد بدست می‌آید. استفاده از زمان و دمای مناسب در مرحله ذوب از شکل گیری مجدد کریستالهای یخ تا حدود زیادی ممانعت نموده و در عین حال موجب می‌گردد تا فعالیتهای آنزیمی سلول اسپرم در بهترین حالت خود حفظ گردد (Yavas and Bozkur, 2011).

نتایج این بررسی نشان داد که با افزایش زمان انجماد میزان درصد تحرک و مدت زمان آن در مقایسه با نمونه اسپرم تازه کاهش می‌یابد. مطالعات پیشین نشان داده است که کیفیت اسپرم پس از انجماد در مقایسه با نمونه تازه از کیفیت کمتری برخوردار است و این مسئله با بررسی میزان تحرک اسپرم، درصد لقاح و مطالعات ریز ساختاری سلول اسپرم به اثبات رسیده است (Cabrita et al. 2005; Li et al 2010). مطالعات فلوسیتومتری بر روی اسپرم ماهی قزل آلا نشان داد که تنها بخش اندکی از سلولهای اسپرم بعد از خارج شدن از انجماد (در بهترین حالت حدود ۱۸٪) دارای غشا سلولی سالم و فعالیت طبیعی میتوکندری هستند (Ogier de Baulny et al. 1997). در اولین قدم باید توجه داشت که فرآیند انجماد و استفاده از رقیق کننده ها موجب وارد آوردن استرس اسمزی و اکسیداتیو به اسپرم میگردد. رادیکالهای آزاد اکسیژنی که طی این فرآیند بوجود می‌آیند سبب پراکسیداسیون چربی دیواره سلول، آسیب دیدن قطعه میانی و ساختار آکسونمی تاژک می‌شوند. همچنین وجود رادیکالهای آزاد اکسیژن اختلال در عملکرد میتوکندری ایجاد نموده، تولید ATP را کاهش می‌دهند. در نهایت مجموعه مشکلاتی که به آنها اشاره شد سبب کاهش درصد تحرک و کوتاه شدن زمان آن شده و در آخر کاهش باروری و لقاح موفق با اسپرم منجمد شده را بدنبال دارند (Cabrita et al. 2005; Li et al 2010).

با توجه به آنچه گفته شد به نظر می‌رسد تهیه یک روش استاندارد انجماد اسپرم که بتوان از آن برای تمام ماهیان آب شیرین و دریا استفاده نمود بسیار سخت است، زیرا موفقیت آمیز بودن این فرآیند بر اساس نوع مواد رقیق کننده، روند انجماد و سیستم خارج ساختن از انجماد در هر گونه ماهی و حتی از یک ماهی نر تا ماهی نر دیگر در همان گونه متفاوت است و در انجام این کار ضروری است شرایط هر گونه بطور خاص مورد مطالعه و بررسی قرار گیرد. لذا ضروری است تا مطالعات تکمیلی در جهت شناسایی رقیق کننده‌های مناسب برای ماهیان ارزشمند دریای خزر و نیز ارزیابی ماندگاری و کیفی بودن اسپرم آنها بعد از بازه‌های زمانی طولانیتر تحت شرایط انجماد مورد بررسی و تحقیق قرار گیرد.

۳-۴ - تکثیر طبیعی

رودخانه های مورد مطالعه اغلب دارای شرایط اکولوژیک یکسانی هستند به گونه ای که می توان نواحی مختلف اکولوژیک (bream zone, barbel zone, grayling zone, trout zone) را مشاهده نمود، به گونه ای که در مناطق فوقانی رودخانه که دارای شیب زیاد و دمای پایین است، زیستگاه تنها گونه این منطقه، قزل آلاي خال قرمز بوده و هر چه به سمت مناطق پایین دست رودخانه ها حرکت نماییم، ضمن کاهش شیب، افزایش دما و عمق آب، تنوع گونه ای نیز اضافه می شود (شکل ۱). نتایج بدست آمده با مطالعه های سایر محققین مطابقت دارد (نادری جلودار، ۱۳۸۳: عبدلی و نادری جلودار، ۱۳۸۷).

اگرچه در نگاه اول به نظر می رسد بسیاری از نقاط این حوضه دارای فون ماهیان یکسانی باشند، بررسی های صورت گرفته، نشان می دهند که تفاوت های بارزی در پراکنش گونه ها در اکوسیستم های رودخانه ای و دریایی

این حوضه وجود دارد. به عنوان مثال تنوع گونه ای ماهیان رودخانه های غربی مانند سفیدرود و ارس بیشتر از رودخانه های شرقی مانند اترک و گرگانرود می باشد (عبدلی و نادری جلودار، ۱۳۸۷). به عنوان مثال گونه هایی مانند *Chondrostoma cyri* و *Alburnus filippi* تنها در رودخانه های ارس و سفید رود وجود داشته و در شرق خزر وجود ندارند و یا در رودخانه های شرقی دریای خزر تاکنون جمعیتی از ماهی قزل آلاهی خال قرمز یافت نشده است. (عبدلی و نادری جلودار، ۱۳۸۷). نتایج مطالعه صورت گرفته در چهار رودخانه تجن، هراز، سردآبرود و چالوس نشان داد که اگرچه مجموع زیستی تمامی رودخانه ها از جمله گونه های ماهیان غالباً مشترک بوده و همه این رودخانه ها دارای نواحی اکولوژیک آزاد ماهیان تا ماهیان پهن هستند، ولی دارای تفاوت هایی نیز هستند. به عنوان مثال تاکنون در رودخانه های سردآبرود و چالوس برخلاف رودخانه های هراز و تجن گزارشی از ماهیان خاویاری وجود ندارد (عبدلی، ۱۳۷۳). عوامل متعددی در پراکنش گونه ها موثرند، عوامل حیاتی نظیر گونه های رقابت کننده، وجود صیادان، منابع غذایی نیز در انتشار گونه ها موثرند. عوامل غیر زنده نیز نقش موثری داشته و وجود یک جامعه در یک زیستگاه ناشی از تجمع گونه هایی است که تحت شرایط غالب عوامل غیر زنده توانسته اند خود را سازگار نمایند (مجنونیان، ۱۳۸۷). هر رودخانه ای از نظر جامعه زیستی ویژگیهای خاص خود را داشته و کاملاً این ویژگیها قابل تعمیم نیستند. بنابراین تشابه و تفاوت ها در مجامع زیستی رودخانه های مورد مطالعه به عوامل فوق مرتبط است. هرچه از سرچشمه رودخانه ها فاصله بگیریم بر میزان تنوع گونه ای افزوده می شود. افزایش عمق آب از قسمت های فوقانی رودخانه به سمت قسمت های پایینی یکی از عوامل مهم در افزایش تنوع گونه ای می باشد. همچنین شیب، جنس بستر، عرض، ارتفاع و پوشش گیاهی حاشیه رودخانه نیز بر تنوع گونه ای ماهیان تأثیر دارند (Foltz, 1982; Fingera, 1982; Adebisi, 1988). علاوه بر این عوامل متعدد فعالیت های انسانی در این رودخانه ها سبب دگرگونی وضعیت پارامترهای کیفی آب و خصوصیات زیستی آنها شده است. بطوری که نتایج ما نشان داد که در تمامی رودخانه های مورد بررسی ایستگاه های بالادست روند ثابت تری از تغییرات را نسبت به ایستگاه های پایین دست نشان می دهند. این مهم می تواند بازگوکننده پیچیدگی های بیشتر فعالیت های انسانی بر نواحی میانی و پایین دست اکوسیستم رودخانه ها باشد.

در بالادست تمامی رودخانه های مورد مطالعه، بدلیل عدم دسترسی آسان با حداقل فعالیت های انسانی، پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب شرایط طبیعی تری را داشتند. اما نواحی میانی و پایین دست اکوسیستم رودخانه ها تحت تأثیر انواع فعالیت های انسانی بوده که اثرات مهمترین آنها را مورد بحث قرار می دهیم.

خروجی پساب استخرهای پرورش ماهی (که میزان آن در رودخانه هراز بیشتر از سایر رودخانه ها است) حاوی مواد آلی زیادی است که ناشی از مصرف مواد غذایی، رشد ماهیان می باشد. این مواد آلی در نتیجه تجزیه زیستی، میزان اکسیژن آب را به شدت کاهش می دهند، دمای آب را افزایش و نهایتاً ضمن افزایش کدورت آب، موجب از دست رفتن تعادل طبیعی اسیدیته در آبهای جاری می شوند، همچنین خروجی پساب، حاوی مقادیر

زیادی ترکیبات نیتروژن دار از جمله آمونیوم است که برای اکوسیستم خطر آفرین است (Raczyynska *et al.*, 2013; Noroozrajab *et al.*, 2012). کاهش اسیدیته، کاهش میزان اکسیژن محلول، افزایش BOD، افزایش آمونیوم، افزایش دمای آب و افزایش EC در ایستگاه های بعد از خروجی پساب بخوبی مشهود است. نتایج مطالعه حاضر با نتایج Raczyynska و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت دارد. توجه به پتانسیل خودپالایی رودخانه، کنترل ظرفیت تولید و استفاده از روش های تصفیه آب استخر ها همچون هوادهی بیشتر و سیستم های برگشت پذیر برای کنترل آلودگی های زیست محیطی ناشی از آبی پروری خصوصا در پایین دست لازم است. نکته دیگری از فعالیت های آبی پروری بر اکوسیستم های طبیعی، دفع مواد شیمیایی است که برای شستن استخرها و تأسیسات استخر به محیط وارد می کنند. ورود مواد گندزدایی همچون کلر، نفتالین، استون و... به محیط بخاطر لزوم شستشوی استخرها ثابت شده است (Patimar *et al.*, 2012).

کاربری بعدی گسترده منطقه مورد مطالعه، فعالیت های کشاورزی است که این فعالیت ها خصوصا در دهه اخیر در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران با مصرف زیاد کودها و سموم شیمیایی همراه بوده است (Mehrdadi *et al.*, 2006). فعالیت های کشاورزی بر اکوسیستم تمامی رودخانه های مورد مطالعه وجود داشته، اما برحسب امکانات موجود تنها رودخانه تجن مورد بررسی قرار گرفت. در مورد تأثیر کشاورزی سنتی بر اکوسیستم (مخصوصا کشت های پرنیاز به آب مانند برنج که کشت اصلی مردم منطقه را تشکیل می دهد) بیان داشته که حجم زیاد آب مصرفی موجب افزایش کدورت آب، افزایش معنی دار دمای آب، کاهش شدید میزان اکسیژن محلول، افزایش مواد غذایی، افزایش معنی داری در فلزات سنگین و آلاینده های آلی بدلیل مصرف کودها و سموم شیمیایی، تغییرات زیاد میزان اسیدیته آبی بطور غیرمستقیم سبب تغییرات زیادی در بستر رودخانه بدلیل فرسایش های کناره ها، ترافیک وسایل حمل و نقل کشاورزی می گردد (Smakhtin, 2002)، تحقیقات زیادی بر تأثیر کشاورزی بر پارامترهای فیزیکی و شیمیایی انجام شده است که از آن جمله می توان به مطالعه Arjmandi و همکاران (۲۰۱۰) اشاره کرد. با مطالعه میزان مصرف سموم ارگانوفسفره برای کشت برنج گزارش دادند که دیازنون بیشترین مقدار را برای مناطق شمال کشور و کنترل آفات برنج دارد، آنها اختلاف شدید معنی داری در ایستگاه شاهد با ایستگاه های تأثیر یافته از پساب کشاورزی در آمل گزارش دادند، زمان ماندگاری این سموم را در رودخانه حدود دوماه بیان نمودند و اثبات کردند که مصرف این سموم موجب افزایش کدورت آب، افزایش دما و کاهش میزان اکسیژن محلول می شود (Arjmandi *et al.*, 2010). سموم ارگانوکلره یکی از سموم کشاورزی مورد استفاده است و بدیهی است در صورت عدم استفاده صحیح از سموم و کود های شیمیایی، تغییرات زیادی در پارامترهای فیزیکی و شیمیایی اتفاق می افتد. فرسایش خاک در نتیجه هموار کردن زمین، ترافیک وسایل مورد نیاز کشاورزی و لزوم نگهداشت آب در معرض نور خورشید و بالا بردن دمای آب آن برای کاربردپذیر بودن در کشت برنج از مهمترین تأثیراتدیگر کشاورزی منطقه بر رودخانه است. مقایسات عددی پارامترهای فیزیکی و شیمیایی ایستگاه های پایین دست با ایستگاه های بالا دست به خوبی نشان دهنده این تأثیرات است.

فعالیت های کارگاه های شن و ماسه که با برداشت ماسه های بستر و کناره های رودخانه، خرد کردن و شستن آنها همراه است، خصوصاً به شیوه باز که در ایران مرسوم است، نه تنها باعث افزایش کدورت و ذرات جامد معلق می شود بلکه کاهش پتانسیل آب برای نگهداشت اکسیژن، افزایش دمای آب، افزایش شدید EC و تغییرات pH را در پی دارند. حضور کارگاه های شن و ماسه در پایین دست تمامی رودخانه های مورد مطالعه بویژه هراز و تجن موجب تغییرات زیادی در پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب شده است، بطوری که مقایسه های عددی در ایستگاه های... با ایستگاه های بالادست موید این مطلب است. به عنوان مثال گل آلودگی شدید ایستگاهی که در فاصله ۵۰۰ متری از رود فرعی زارم قرار گرفته، ناشی از فعالیت های زیاد کارگاه های شن و ماسه در امتداد این سرشاخه است. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعات Sadeghi و همکاران (۲۰۱۴) و Yergeau و همکاران (۲۰۱۲) همخوانی دارد.

پساب های شهری و صنعتی موجب تغییرات زیادی در پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب رودخانه های مورد مطالعه شده است، بطوری که پساب کارخانه صنایع چوب و کاغذ ساری حاوی مواد آلی زیادی است که مستقیماً وارد رودخانه تجن می شود. متأسفانه ضمن تغییر رنگی که پساب کارخانه مذکور در آب رودخانه دارد (حالت قهوه ای کدر)، باعث تغییراتی در پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب می شود. مطابق با مطالعه Walker و همکاران (۲۰۱۲) پساب خروجی صنایع چوب و کاغذ حاوی مواد آلی زیاد است که برای تجزیه، شدیداً نیازمند اکسیژن است. لذا میزان اکسیژن محلول در آب را نه تنها به دلیل تجزیه زیستی پساب، بلکه بدلیل تغییر رنگ و به دنبال آن تغییر دمای طبیعی آب ناشی از تأثیرگذاری بیشتر تابش نور خورشید یا در صورت وجود خروجی گرم پساب، ناشی از خود پساب، شدیداً کاهش می دهد. Thompson و همکاران (۲۰۰۱)، خروجی پساب صنایع کاغذسازی را سومین منبع مهم آلاینده بعد از صنایع مواد شیمیایی و صنایع فلزی نام بردند، که بدلیل استفاده از مواد شیمیایی جهت شستشو، فرآوری و اصلاح چوب به همراه مواد آلی می تواند به شدت بر پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب تأثیرگذار باشند. نتایج مطالعه حاضر با نتایج Shokri و همکاران (۲۰۱۴) و Ahmadi و همکاران (۲۰۱۱) همخوانی دارد، بطوری که کاهش شدید میزان اکسیژن محلول در آب را حتی در فاصله بیش از ۵۰۰ متری از کارخانه تأیید کردند.

تأثیر موانع فیزیکی مانند پای پل ها، انواع سد های انحرافی و مخزنی و ... بر اکوسیستم رودخانه ها و مجامع زیستی آنها (بویژه ماهیان) در دنیا ثابت شده است. این دسته عوامل دارای تأثیرات معنی داری بر اکوسیستم تمامی رودخانه های مورد مطالعه داشتند. بطوری که سد بزرگ و قدیمی شهید رجایی رودخانه تجن موجب شده بود تا آب خروجی سد، از کیفیت بالا و مقادیر مناسبی از پارامترهای فیزیکی و شیمیایی برخوردار باشد. Caudill و همکاران (۲۰۰۷) با مطالعه تغییرات اکولوژیکی سد در رودخانه کلمبیا در کانادا، نگهداشت آب، ته نشست رسوبات و ذرات معلق در آب، کاهش کدورت آب، کاهش معنی دار دمای آب خروجی سد، کاهش مواد غذایی و همچنین مواد سمی محلول در آب در نتیجه فرصت ته نشست و نهایتاً افزایش ظرفیت آب

خروجی برای نگهداشت بیشتر اکسیژن محلول را از جمله تغییرات مثبت سدها عنوان کردند. نتایج پایین دست سد به خوبی تعادل پارامترهای فیزیکی و شیمیایی را نشان می دهد، بطوری که مطابق مطالعات EPA، بهترین مقدار pH در رودخانه حدود ۸، میزان BOD نزدیک صفر، عدم وجود مواد غذایی و میزان جامدات محلول کمتر از ۱۰۰ است.

تعداد خانواده بزرگ بی مهرگان کفزی نه تنها خود می تواند شاخصی از وضعیت اکولوژیک یک رودخانه باشد بلکه در ارزیابی اکولوژیک رودخانه توسط اکثر شاخص های زیستی به عنوان یک جزء حضور دارد (Scott, 1998).

همانطور که انتظار می رفت در نواحی که کمتر تحت تأثیر فعالیت های انسانی قرار داشتند (بالا دست رودخانه ها)، تعداد افراد و گروه های راسته های حساس به آلودگی (EPT) Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera بیشتر حضور دارند. کمترین تعداد افراد از این راسته ها در نواحی از رودخانه ها حضور داشتند که نه تنها در پایین دست رودخانه ها قرار دارند بلکه تحت تأثیر آلاینده های کارگاه های شن و ماسه، استخرهای پرورش ماهی، شهری و کارخانه صنایع چوب و کاغذسازی بودند. هرچند تعداد و ترکیب این سه راسته نیز به تنهایی در رودخانه ها نمی تواند ارزیابی کامل و دقیقی از اکوسیستم داشته باشد ولی کاربرد وسیعی برای ارزیابی های سریع و برنامه های پایش منظم دارند (Ogren, 2014).

شاخص های زیستی EPT و تنوع شانون برخلاف شاخص هیلسنهوف (HFBI) در نواحی که تحت تأثیر انواع آلاینده ها بودند، کمتر از بالادست تمامی رودخانه ها بودند. همچنین گروه های کارکرد تغذیه ای نیز همانند سایر شاخص ها وضعیت کیفی آب بهتر بالادست رودخانه ها را تأیید می کند. برای بحث بهتر در مورد ارزیابی اکولوژیک توسط بزرگ بی مهرگان کفزی، لازم است ابتدا روابط پارامترهای کیفی آب و زیستگاهی با بزرگ بی مهرگان کفزی بررسی شود. توزیع بزرگ بی مهرگان کفزی در درجه نخست تحت تأثیر پارامترهای فیزیکی و شیمیایی میزان اکسیژن محلول، دمای آب، مواد مغذی و TDS و سپس تحت تأثیر پارامترهای زیستگاهی خلل و فرج سنگ ها، پوشش گیاهی، عمق و جریان آب بوده است. از آنجایی که میزان شدت فعالیت های انسانی بر پارامترهای کیفی آب تأثیر دارد (Amirkolaie, 2008)، لذا توزیع بزرگ بی مهرگان کفزی را تحت تأثیر قرار می دهد. تعیین مهمترین پارامترهای فیزیکی و شیمیایی موثر بر توزیع بزرگ بی مهرگان کفزی را منوط به شناخت و اطلاعات کامل از نوع آلاینده های انسانی است و حتی سلايق کشاورزان در انتخاب سموم و کودها، قابلیت دسترسی و استفاده، زمان و مقدار استفاده و... می تواند موجب تغییر تأثیرات پارامترها بر آبریان باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش میزان اکسیژن محلول آب، گروه های حساس افزایش یافتند. مقادیر فسفات و نترات نیز از جمله پارامترهای مهم در توزیع بزرگ بی مهرگان کفزی بودند که این نتایج با نتایج دیگران در سایر رودخانه های ایران همخوانی دارد (Varnosfaderany et al., 2010; Shokri, et al., 2014). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که وجود سنگ های بزرگ (در بالادست رودخانه ها) برای لانه سازی

بسیاری از گونه‌های بزرگ بی مهرگان کفزی خصوصاً Trichoptera ضروری است، با وجود سنگ‌های بزرگ امکان حضور سایر گونه‌های حساس نیز وجود دارد، این درحالی است که معمولاً گونه‌های مقاوم در گل و لای‌ها زیست می‌کنند. Jussi و همکاران (۲۰۱۴) در چین، ساختار بستر، میزان شدت جریان آب و شرایط پوشش گیاهی کناره‌ها را در حفظ تنوع زیستی طبیعی رودخانه Yalutsangpo مهم بیان کردند، لذا نتایج مذکور در این مطالعه با مطالعه آنان همخوانی دارد.

میزان اکسیژن محلول، اولین پارامتر در توزیع گونه‌های ماهی بوده است که شدیداً نیز با دمای آب در ارتباط است بطوری که افزایش ناچیزی در دمای آب رودخانه و دریاچه‌ها موجب کاهش معنی داری در میزان اکسیژن محلول در آب می‌شود، ضمن آنکه ظرفیت نگهداشت آب را نیز برای میزان اکسیژن کاهش می‌دهد، Buentello و همکاران (۲۰۰۰) با مطالعه تأثیر دما و میزان اکسیژن محلول در آب بر فعالیت‌های روزانه ماهیان اثبات کردند که با افزایش میزان اکسیژن محلول در آب تمایل گونه‌های حساس ماهی به تغذیه، تولید مثل و فعالیت‌های روزانه بیشتر می‌شود، نتایج آزمون‌های مطالعه آنان، همبستگی بیش از ۷۰ درصدی میزان اکسیژن محلول و میزان جذب روزانه را در گربه ماهی نشان می‌دهد. نتایج مطالعه حاضر نیز سهم بالای تأثیر این پارامترها بر گونه‌های ماهی در رودخانه‌های مورد بررسی را نشان داد. میزان رسوب گذاری و میزان خلل و فرج سنگ‌ها دو پارامتر تأثیرگذار بر توزیع ماهیان بوده است. Brian و همکاران (۲۰۰۱) در آمریکا ارتباط معنی داری بین میزان خلل و فرج سنگ‌ها، اندازه ذرات رسوبات و پوشش گیاهی کناره‌ها با جمعیت گونه‌های حساس ماهی گزارش دادند و با نتایج این مطالعه نیز مطابقت دارد، بطوری که با کاهش اندازه ذرات و کاهش میزان خلل و فرج سنگ‌های بستر، تعداد گونه‌های حساس کم و یا حذف می‌شوند. Kieth و همکاران (۲۰۰۶) با مطالعه در باره پارامترهای زیستگاهی و جوامع ماهیان در سه مقیاس کل آبخیز، رودخانه‌های کوچک و هر ایستگاه، تأثیر میزان پوشش گیاهی حاشیه و شدت جریان آب را بر روی رسوبگذاری و پتانسیل نگهداشت شکاف‌های بزرگ در سنگ‌ها که موجب درهم غلتیدن آب و افزایش میزان اکسیژن محلول می‌گردد، نسبت به سایر پارامترهای فیزیکی زیستگاه مهمتر گزارش دادند. همبستگی میزان خلل و فرج سنگ‌ها به پوشش گیاهی حاشیه زیاد است، به این معنا که با کاهش پوشش گیاهی کناره‌ها، میزان فرسایش بر اثر بارندگی بیشتر می‌شود و رسوبات حاصله از فرسایش به درون سنگ‌ها راه می‌یابند (Nerbonne and Vondracek, 2001). در این مطالعه مشخص شده، فعالیت‌های انسانی که سبب تغییر BOD شود با میزان اکسیژن محلول در آب نیز همبستگی دارد. بنظر می‌رسد با کم شدن دبی آب، تأثیر مواد مغذی نیترات و فسفات ناشی از کودهای شیمیایی بر آب رودخانه‌ها بیشتر شده است. Smakhtin (۲۰۰۲) با مطالعه بر تأثیر جریان آب، کاهش دبی آب رودخانه و آبیاری سنتی بر میزان پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب رودخانه، این ادعا را ثابت نمود که با کاهش دبی، سهم تأثیرات کشاورزی بیشتر می‌شود. مطالعه حاضر نیز نشان داد که در نواحی بالادست رودخانه‌ها با مقادیر کمتر آلاینده‌های خاص، تراکم ماهیان حساس وابسته به میزان اکسیژن بالا بیشتر بودند.

تخریب زیستگاه که بیشتر گونه های مهاجر از دریا به رودخانه را تحت تاثیر قرار داده و چرخه زندگی آنها را بخصوص در دوره تولید مثل بر هم زده، یکی از علت های اصلی در معرض خطر انقراض قرار گرفتن بسیاری از ماهیان دریای خزر است. زایشگاه و پرورشگاه گونه های ماهیانی نظیر آزاد ماهی خزر (*Salmo trutta caspicus*) و سس ماهی دریای خزر (*Luciobarbus brachycephalus*) در پایین دست رودخانه های این حوضه می باشد. متأسفانه ارزش های زیستگاهی رودخانه های سردآبرود، چالوس، هراز و تجن تحت تاثیر فعالیت های موثر انسانی نظیر محل دفع زباله ها، فاضلاب و پساب های کشاورزی، صنعتی و شهری، انواع سد های مخزنی و انحرافی و سایر عوامل تخریب کننده بشدت تغییر کرده است. به همین دلایل امکان تکثیر و پرورش گونه های ماهیان در معرض خطر مانند گونه های فوق از بین رفته و یا به حداقل رسیده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فراوانی برخی از گونه های ماهیان کم شده و یا به کلی ناپدید شدند. روند جایگزینی گونه هایی که دامنه تحمل پذیری بیشتری دارند، در رودخانه های فوق صورت گرفته و حتی در مقایسه با نتایج سایر مطالعات در گذشته (عبدلی، ۱۳۷۳؛ نادری جلودار، ۱۳۷۸)، گونه های غیر بومی حضور بیشتری یافتند. نتایج این مطالعه با مطالعات (Naylor et al., 2000) و (FAO 1998) همخوانی دارد. بنابراین در دراز مدت برای حفظ نسل بسیاری از گونه های ماهیان دریای خزر و به عبارت بهتر نجات این اکوسیستم، چاره ای نیست تا حداقل تعدادی از رودخانه های این حوضه را ضمن استفاده معقول از آن ها برای بقاء اکوسیستم خزر حفاظت نماییم.

سد شهید رجایی رودخانه تجن مانع فیزیکی مهمی در مسیر مهاجرت گونه های ماهیان ایجاد کرده، بطوری که قبل از ایجاد سد حتی ماهیان خاویاری برای تخمریزی به بالادست رودخانه تجن (سرشاخه های شیرین رود و سفید رود) مهاجرت داشتند (گزارشات محلی). Caudill و همکاران (۲۰۰۷) امکان قطع ارتباط زیستی و ژنتیکی گونه های بالادست و پایین دست سد، تغییرات بستر رودخانه و در پی آن تغییر در زیستگاه ماهیان جهت اعمال حیاتی خود را از جمله تغییرات منفی ناشی از سد عنوان کردند. نتایج مطالعه حاضر با نتایج Sharghi و همکاران (۲۰۱۱) در مورد تغییرات ساختار جمعیتی ماهیان و جدایی جمعیت های گونه های مختلف ماهیان ناشی از سد همخوانی دارد. در عین حال افزایش کیفیت پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب را نیز ناشی می شود.

علیرغم اثرات منفی زیاد سد شهید رجایی تجن بر اکوسیستم رودخانه، شرایط نسبتاً مطلوبی را برای برخی از گونه های ماهیان رودخانه فراهم نمود. Sheldon (1968) معتقد است که عمق آب تأثیر زیادی در افزایش تنوع گونه ای دارد، زیرا گونه های مختلف از لایه های مختلف غذایی تشکیل شده استفاده می نمایند. در همین راستا Foltz (1982) به شکل دیگری معتقد است عمق زیاد آب باعث افزایش کنج های بوم شناسی شده که این خود بر گونه های مختلف اثر می گذارد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تعداد قابل توجه ای از گونه های ماهیان نظیر ماهی سفید رودخانه ای (*Squalius cephalus*)، سیاه ماهی (*Capoeta capoeta*)، سس ماهی لب نازک (*Barbus lerta*)، سس ماهی لب کلفت (*Barbus mursa*) و سس ماهی در معرض تهدید *Luciobarbus capito* در حوضه جنوبی در دریاچه پشت سد و بالا دست آن زندگی می نمایند. دو فرم از گونه *Luciobarbus capito* در حوضه جنوبی

دریای خزر وجود دارد. فرمی که در دریا زندگی نموده و برای تولید مثل به رودخانه‌ها مهاجرت نموده و دیگری فرمی که برای همیشه در قسمت‌های میانی رودخانه‌ها که دارای بستر قلوه سنگی و سرعت آب کمتر از ۱ متر در ثانیه با دمای متوسط آب ۱۵ تا ۲۰ سانتی گراد زندگی می‌نمایند (عبدلی و نادری جلودار، ۱۳۸۷). نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب سنی و وزنی مختلفی از این گونه، در دریاچه پشت سد زندگی کرده و در سرشاخه‌های شیرین رود و سفید رود تولید مثل می‌کند. فرم دریایی آن در دمای مناسب ۱۸ تا ۲۲ درجه سانتی گراد در بخش‌های میانی و پایین دست رودخانه تولید مثل می‌کند. بستر مناسب برای تولید مثل این گونه در رودخانه سردآبرود قلوه سنگی، در سرعت جریان زیاد آب (۱ متر بر ثانیه) دمای آب ۲۲ درجه سانتی گراد و عمق آب ۰/۵ متر گزارش شد (عبدلی و نادری جلودار، ۱۳۸۷).

همانطور که بیان شد تمامی رودخانه‌های مورد مطالعه تمامی نواحی اکولوژیک را دارا هستند، با این تفاوت که طول رودخانه‌های سردآبرود و چالوس کوتاه‌تر از رودخانه‌های هراز و تجن بوده و شیب بستر آنها بیشتر است. بهمین خاطر وسعت هر ناحیه در دو رودخانه تجن و هراز بیشتر می‌باشد. در رودخانه تجن Barbel Zone نسبتاً وسعت بیشتری داشته و دریاچه پشت سد و بالادست آن در هر دو سرشاخه شیرین‌رود و سفیدرود اکثر نواحی اکولوژیک وجود دارد. تمامی گونه‌های ماهیان در معرض خطر انقراض گونه‌های مهاجر از دریا به رودخانه بوده و مهاجرت تولید مثلی آنها حتی ماهیان خاویارری تا ۱۰۰ کیلومتر در رودخانه تجن گزارش شده (لالویی، ۱۳۷۸: عبدلی و نادری جلودار، ۱۳۸۷: گزارشات محلی در گذشته). سس ماهی دریای خزر *Luciobarbus brachycephalus* به شدت در معرض خطر انقراض بوده و همانند سس ماهی *Luciobarbus capito* متعلق به خانواده Cyprinidae می‌باشد. دمای مناسب برای تولید مثل آن ۲۰ تا ۲۳ درجه سانتی گراد و بستر تولید مثل قلوه سنگی می‌باشد. اوج مهاجرت این گونه در تابستان زمانی که دمای آب ۲۵ تا ۲۷ درجه سانتی گراد است (عبدلی و نادری جلودار، ۱۳۸۷). بچه ماهیان سس ماهیان فوق از زئوپلانکتونها و ماهیان بالغ از موجودات کف‌زی (لارو حشرات، سخت‌پوستان، نرم‌تنان، ماهیان) تغذیه می‌نمایند. براساس گزارشات محلی (قبل از ایجاد سد) ماهیان خاویاری در رودخانه تجن تا ۷۵ کیلومتر مهاجرت تولید مثلی داشتند. از آنجایی که بالادست سد منطقه حفاظت شده بوده، بدلیل عدم دسترسی آسان کمترین فعالیت‌های انسانی بر اکوسیستم رودخانه وارد شده، نتایج این مطالعه نشان داد که با توجه شرایط خاص ایجاد شده در دریاچه پشت سد و بالادست آن امکان زندگی برای آنها وجود دارد. گونه‌های مهاجر نظیر شاه‌کولی (*Alburnoids chalcoides*) سیاه‌کولی (*Vimbavimba*) که متعلق به خانواده Cyprinidae بوده و با شرایط تولید مثلی سس ماهیان *Luciobarbus* و *Luciobarbus capito* *brachycephalus* همپوشانی دارند (بستر مناسب برای تولید مثل قلوه سنگی و سرعت آب ۱/۳ متر در ثانیه)، اکوسیستم سد شهید رجایی و بالادست آن به عنوان ذخیره گاه ژنتیکی احتمالی این دسته ماهیان قابل استفاده است. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود از آنجایی که متأسفانه تاکنون توجه‌ای به احیاء اکوسیستم‌های تخریب شده (بیشتر مشکلات مربوط به رودخانه‌های این منطقه است) نشده است و با توجه به اینکه برخی گونه‌های ماهیان

این حوضه، جمعیت های خوبی را در دریاچه پشت سد و بالادست آن دارند و شرایط جدید زیستگاهی شکل گرفته در منطقه مورد مطالعه، ذخیره گاه ژنتیکی مطلوبی برای گونه های ماهیان در معرض خطر این حوضه می باشد. این ذخیره گاه فرصتی را ایجاد کرده تا همانند تکثیر مصنوعی برخی گونه ها نظیر ماهی سفید و ماهی آزاد دریای خزر با حفظ نسل گونه های در معرض خطر انقراض، موانع موجود در مسیر تولید مثل طبیعی گونه ها را برداشته و بقا نسل آن ها را به صورت طبیعی تضمین نماید.

پیشنهادهای

- ۱- در مورد انجماد اسپرم، به نظر می‌رسد تفاوت‌های گونه‌ای امری بسیار مهم است که باید دقیقاً در مراحل انجام کار مد نظر قرار گیرد. همچنین استفاده از یک پروتکل واحد امکان موفقیت بسیار کم است زیرا واکنش سلولهای اسپرم در برابر عوامل شیمیایی که بعنوان رقیق کننده بکار می‌روند متفاوت است. لذا ضروری است جهت دستیابی به اطلاعات مناسب جهت حفظ سلولهای جنسی ماهیان ارزشمند دریای خزر با استفاده از روش انجماد، مطالعات تکمیلی در خصوص خصوصیات اسپرم هر گونه، رقیق کننده‌های مناسب و نیز فرآیند انجماد انجام گیرد.
- ۲- بدیهی است بهترین روش حفظ اکوسیستمهای آبی (سواحل و کرانه‌های دریا، رودخانه‌ها و دریاچه‌های پشت سدها) در حوضه جنوبی دریای خزر و جلوگیری از آلودگی آنها بمنظور تکثیر طبیعی ماهیان می‌باشد. لذا ضروری است که سازمانهای ذیربط اهتمام کامل در این زمینه بنمایند.

منابع

- بریمانی، ا.، ۱۳۵۶. ماهی شناسی و شیلات. انتشارت دانشگاه تهران، جلد اول.
- چکمه دوز، ف.، ۱۳۸۸. بررسی امکان تمایز ژنتیکی و مقایسه ساختار ژنتیک جمعیت ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) نژاد بهاره و پاییزه با استفاده از روش تعیین توالی DNA (DNA Sequencing) و Microsatellite. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان.
- خارا، ح.، ۱۳۸۳. بررسی وجود تنوع مورفومتریکی، مریستیک و ژنتیک مولکولی درون گونه ای ماهی سیم (*Abramis brama orientalis*) در تالاب انزلی، سواحل جنوبی دریای خزر، دریاچه سد ارس و جمهوری آذربایجان. پایان نامه دکتری شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.
- رضایی، م.؛ ع. شعبانی، ب. شعبانپور، و ح. کشیری. ۱۳۸۹. بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت ماهی سفید در سواحل استان گلستان با استفاده از نشانگر ریز ماهواره. مجله علمی شیلات ایران، ۲۰(۳)، ص ۱۵۵-۱۵۱.
- رضوانی گیل کلانی، س.، ف. لالونی، ر. عقیلی و ح. ابراهیم زاده موسوی. ۱۳۸۵. معرفی نشانگرهای ژنتیکی برای شناسائی وجداسازی پنج گونه از کپور ماهیان دریای خزر به روش PCR-RFLP. مجله علمی شیلات ایران، ۱۵(۴)، ص ۵۸-۴۹.
- رفیعی، الف.، ۱۳۸۵. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*). پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان.
- روشن طبری. م. ۱۳۷۳. هیدرولوژی و هیدروبیولوژی رودخانه تجن. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. گزارش نهائی پروژه تحقیقاتی
- ریحانی، س.، ۱۳۸۷. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کلمه سواحل ایران و روسیه با استفاده از روش میکروساتلایت، پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران.
- سازمان شیلات ایران، صورتجلسه کمیته علمی آمار صید سازمان شیلات ایران، آمار صید سال ۱۳۹۴-۹۵، با احتساب صید خارج از کنترل.
- شجاعی، ل.، ۱۳۸۸. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سفید بهاره و پاییزه رودخانه های گیلان و مازندران به روش میکروستلایت. پایان نامه دکترای بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران.
- عباسی، ک.، ع. ر. ولی پور، د. طالبی حقیقی، ع. ن. سرپناه، و ش. ع. نظامی بلوچی. ۱۳۷۸. اطلس ماهیان ایران، آبهای داخلی گیلان. بندر انزلی: مرکز تحقیقات شیلات گیلان.
- عبدالحی، ح. ع.، س. رضوانی گیل کلانی، ف. لالونی، م. ج. تقوی، م. حسن زاده صابر، و م. نیرانی. ۱۳۸۹. ساختار ژنتیک جمعیت ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از روش مولکولی. تهران: مؤسسه تحقیقات شیلات ایران.

- عبدلی. ا. ۱۳۷۳. هیدرولوژی و هیدروبیولوژی رودخانه های سردآبرود و چالوس. موسسه تحقیقات شیلات ایران. گزارش نهائی پروژه تحقیقاتی،
- عبدلی. ا. ۱۳۷۳. بوم شناسی جمعیت های ماهیان رودخانه های سردآبرود و چالوس در استان مازندران، ۹۴ ص.
- عبدلی. ا. و نادری. م. ۱۳۸۷. تنوع زیستی ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر. انتشارات علمی آبریان. ۲۴۲ ص.
- عمادی، ح.، ۱۳۶۴. ماهی آزاد دریای خزر بزرگترین نوع قزل آلای قهوه ای. ماهنامه آبریان، ۴، ص ۶-۲.
- قریب خانی، م.، ۱۳۸۸. بررسی ساختار ژنتیک جمعیت و فیلوژنی سوف حاجی طرخان (*Perca fluviatilis*) در تالاب های انزلی و امیر کلايه لاهیجان و سوف سفید (*Sander lucioperca*) در سد ارس و حوضه جنوب غربی دریای خزر. رساله دکتری شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.
- کریم پور، م. و ن. حسین پور. ۱۳۶۷. ماهی آزاد دریای مازندران. تهران: مؤسسه تحقیقات شیلات ایران.
- لالوئی. ف، س. رضوانی گیلکلائی، م. نیرانی، و ج. تقوی. ۱۳۸۵. بررسی مولکولی جمعیت ماهی کیلکای معمولی در حوضه جنوبی دریای خزر به روش PCR-RFLP. مجله علمی شیلات ایران. ۱۵(۲)، ص ۱۲۸-۱۱۹.
- لالوئی، ف.، س. رضوانی گیل کلائی، ر. فاطمی، و ج. تقوی. ۱۳۸۷. بررسی ژنتیک جمعیت ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) حوضه جنوبی دریای خزر با استفاده از mtDNA (PCR- RFLP). مجله علمی شیلات ایران، ۱۷(۲)، ص ۸۹-۱۰۱.
- لالویی. ف. ۱۳۷۸. بررسی مهاجرت ماهیان خاویاری در رودخانه تجن. موسسه تحقیقات شیلات ایران. گزارش نهائی پروژه تحقیقاتی،
- مجنونیان. ه. ۱۳۷۸. حفاظت رودخانه ها. سازمان حفاظت محیط زیست. ۱۲۱ ص.
- مهندسین مشاور پژوهاب. ۱۳۶۶. مطالعات مرحله اول سد های انحرافی چالوس و سردآبرود.
- نادری. م. ۱۳۷۸. بررسی سن و رشد، تولید مثل و رژیم غذایی ماهی سفید رودخانه ای در رودخانه تجن (پایان نامه کارشناسی ارشد- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شمال تهران)، ۱۰۰ ص.
- نادری جلودار. م. ۱۳۸۳. اطلس ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر. پژوهشکده اکولوژی دریای خزر
- نادری جلودار. م. ۱۳۸۷. تأثیر پساب مزارع تکثیر و پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان رودخانه هراز بر گروه های تغذیه ای بزرگ بی مهرگان کفزی، رساله دکتری- دانشگاه تربیت مدرس تهران.
- نجار لشکری، س.، ۱۳۹۲. مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت ماهی آزاد (1877) در پنج رودخانه حوضه جنوبی دریای خزر ایران. پایان نامه دکترای شیلات، دانشکده آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.
- نویدی مقدم فومنی، ر.، ۱۳۸۴. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی آزاد دریای خزر جمعیت منطقه تنکابن با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره. پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان.

- Adams, B.K. and A. Hutchings. 2003. Micro geographic population structure of brook char: a comparison of microsatellite and mark-recapture data. *Journal of Fish Biology*, 62:517-533.
- Adebisi, A.A. 1988. Change in the structural and functional components of the fish co- Ahmadi, M., Khorasani, N., Rafiee, G. 2011. Investigation of pollution sources and water quality of Tajan river. *Journal of Natural Environment*. 63(4): 327-17
- mmunity of a seasonal river. *Arch. Hydrobiol.*
- Alam, S. and S.H. Islam. 2005. Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, 230: 65-80.
- Alarcon, J. A., A. Magoulas, and M. Alvarez. 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European population of the gill head sea bream. *Aquaculture*, 230:65-80.
- Alavi, S. M.H., Cosson, J., 2006, Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*. 30:1-14
- Alvarez, B., Arenal, A., Fuentes, R., Pimentel, R., Abad, Z., Pimentel, E., 2008, Use of post-thaw silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) spermatozoa to increase hatchery productions. *Methods in Reproductive Aquaculture, Marine and Freshwater Species. Biology series*, CRC Press (Taylor and Francis group), pp 345–349
- Amirkolaie, AK. 2008. Environmental impact of nutrient discharged by aquaculture waste water on the Harazriver. *J Fish Aquat Sci*. 3(5) : 275-279
- Arjmandi, R., Tavakol, M., Shayeghi, M. 2010. Determination of organophosphorus insecticide residues in the rice paddies. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 7(1): 175-182
- Asturiano, J. F., Pe´rez, L., Marco-Jime´nez, F., Olivares, L., Vicente, J. S.; Jover, M., 2003, Media and methods for the cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm. *Fish Physiology and Biochemistry*. 28: 501–502.
- Babiak, I., Ottesen, O., Rudolfson, G., Johnsen, S., 2006, Chilled storage of semen from Halibut, *Hippoglossus hippoglossus*: optimizing the protocol. *Theriogenology* 66: 2025–2035.
- Banks, M. A., V.K. Rashbrook, M.J. Calavetta, C.A. Dean and D. Hedgecock 2000. Analysis of microsatellite DNA resolves genetic structure and diversity of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in Californian's central valet. Pp. 915-927.
- Beacham, T.D., B. McIntosh and C. Macconnachie. 2004. Microsatellite identification of individual sockeye salmon in Barkley Sound, British Colombia. *Journal of Fish Biology*, 61: 1021-1032.
- Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W., Suquet, M., 1995, Sperm physiology and quality. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), *Broodstock nagementm and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science, Oxford, pp. 25–52.
- Brigitte, J., M. Hansel and V. Loeschcker. 2005. Microsatellite DNA analysis of northern pike (*Esox lucius*) populations: insights into the genetic structure and demographic history of a genetically depauperate species. *Biology Journal of Linnean Society*. 84:1-11.
- Brown, B., H.P. Wang, L. Li, C. Givens and G. Wallat. 2007. Yellow perch strain evaluation I: Genetic variance of six broodstock populations. *Aquaculture*, 271:142–151.
- Buentello, JA., Gatlin, DM., Neill, WH. 2000. Effects of water temperature and dissolved oxygen on daily feed consumption, feed utilization and growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*. 182(3): 339–352
- Cabrita, E., Robles, V., Cuñado, S., Wallace, J. C., Sarasquete, C., Herráez, M. P., 2005, Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubes. *Cryobiology* 50: 273–284.
- Cabrita, E.; Robles, V.; Herráez, M. P., 2008: *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species. Biology series*, CRC Press (Taylor and Francis group), pp: 547.
- Caudill, CC., Daigle, WR., Keefer, ML., Boggs, CT., Jepson, MA., Burke, BJ. 2007. Show dam passage in adult Columbia river Salmonids associated with unsuccessful migration: delayed negative effects of passage obstacles or condition –dependent mortality? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 64(7): 979-995
- Charlesworth, B. 1998. Measures of divergence between populations. *Molecular evolution and edition*. 15, 538-543.
- Chauhan, T., K.K., Lal, V. Mohinra, R. Singh, P. Punia, C.S. Prakash and W.S. Lakra. 2007. Evaluating genetic differentiation in wild populations of Indian major carp, *Cirrhinus mirgala* evidence from allozyme and microsatellite. *Aquaculture*, 269:135-149.
- Chereguini, O., García de la Banda, I., Herrera, M., Martinez, C., De la Hera, M., 2003, Cryopreservation of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) sperm: fertilization and hatching rates. *Aquaculture Research*. 34:739–747.

- Chistiakov, D.A., B. Hellemans and F.A.M. Volckaert. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255: 1–29
- Conover, W.J., 1980. Practical nonparametric statistics, 2nd edition. Wiley, New York. 219 p.
- Cui, J. z., X.Y. Shen, G.P. Yang, Q.L. Gong and Q.Q. Gu. 2005. Characterization of microsatellite DNAs in *Takifugu rubripes* genome and their utilization in the genetic diversity analysis of *T. rubripes* and *T. pseudommus*. *Aquaculture*, 250: 129–137.
- Dahle, J., E. Pettersson, J. Dannewitz, T. Jarvi and A.C. Lof. 2006. No difference in survival, growth and morphology between offspring of wild-born, hatchery and hybrid brown trout (*Salmo trutta*). *Ecology of Freshwater Fish*, 15: 388–397.
- David, L., P., Rajasekaran, J. Fang, J. Hillel and U. Lavi. 2001. Polymorphism in ornamental and common carp strains (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by AFLP analysis and a new set of microsatellite markers. *Molecular Genetic Genomics*. 266: 353–362.
- Dewoody, J. A. and J.C. Avise. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56: 461–473.
- Dorak, T., 2005. Basic population genetics. WWW. Dorak. Info/ genetics/popgen. Html.
- Dumont, H. J., 1995. The Caspian Lake: history, biota, structure, and function. Limnology FAO. 1998. Rehabilitation of rivers for fish. Published by arrangement with the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). PP. 260
- and Oceanography, 43: 44–52.
- Farajzadeh, M. and Fallah, M., 2009. Assessing the effect of land use changes on floods with using remote sensing in Tajanriver, Geographical Research, 64: 89–104. (Translate in P- Fingera, T.R. 1982. Fish community habitat relation in a central New Yourk stream. *J. Freshwater ecology*. V.1,N.4
- Foltz, J.W. 1982. Fish species diversity and abundance in relation to stream habitat characteristics. *Proc. Annu. Conf. Southeast. Assoc. Fish and Wild. Agencies* 36: 305–311
- ersian)
- Froufe, E., L. Magyary, I. Lehocky and S. Weiss 2002. mtDNA sequence data supports an Asian ancestry and single introduction of the common carp into the Danube Basin. *Journal of Fish Biology*, 61: 301–304.
- Hedrick, P.W. 1999. Genetic of population. Arizona State University.
- Horváth, A.; Wayman, W. R., Dean, J. C., Urbányi, B., Tiersch, T. R., Mims, S. D., Johnson, D., Jenkins, J. A., 2008, Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American Acipenseriform species: a retrospective study. *Journal of Applied Ichthyology*. 24: 443–449
- Jamshidi. Sh. and M.R. Kalbasi. 2011. Conspecific relation between two seasonal migratory forms of endangered Caspian trout, *Salmo trutta caspius* Kessler, 1877, revealed by RAPD markers. *Iranian Journal of Fisheries Science*, 10 (3): 437–446.
- Jodun, W., King, K., Farrell, P., 2006, Methanol and Egg Yolk as Cryoprotectants for Atlantic Salmon Spermatozoa, *North American Journal of Aquaculture* 69: 36–40
- Karr, J. R., 1998, Rivers as Sentile: Using the Biology of Rivers to Guide Landscape Management, final report for USEPA, 28p.
- Kazanchev, E. N., 1981. Ryby Kaspiiskogo Morya [Fishes of the Caspian Sea]. Legkaya I Pischchevaya Promyshlennost, Moskva.
- Keyvanshokoo, S., A. Ghasemi, M. Shahriari-Moghadam, R.M. Nazari, and M. Rahimpour. 2007. Genetic analysis of *Rutilus rutilus caspicus* (Jakowlew, 1870) populations in Iran by microsatellite markers. *Aquaculture Research*, 38: 953–956.
- Kitanishi, S., K. Edo, T. Yamamoto, N. Azuma, O. Hasegawa and S. Higashi. 2007. Genetic structure of masu salmon (*Oncorhynchus masou*) populations in Hokkaido, northernmost Japan, inferred from mitochondrial DNA variation. *journal of Fish biology*, 71(sc): 437–452.
- Kotlik, P., and P. Berrebi. 2002. Genetic subdivision and biogeography of the Danubian rheophilic barb *Barbus petenyi* inferred from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24: 10–18.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei. 2008. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics*, 5: 150–163.
- Lahnsteiner, F., 2000, Semen cryopreservation in the salmonide and in the Northern pike, *Aquaculture Research*, 31: 245 – 258
- Laloei, F., S. Rezvani and M.J. Taghavi. 2013. Genetic Diversity and Differentiation of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) in the southern part of Caspian Sea by using microsatellite markers. *Asian Fisheries Science*, 26: 115–127.

- Li, D., D. Kang, Q. Yin, Z. Sun and L. Liang. 2007. Microsatellite DNA marker analysis of genetic diversity in wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *Genetics and Genomics*, 34: 984-993.
- Li, P., Li, Z. H., Dzyuba, B., Hulak, M., Rodina, M., Linhart, O., 2010, Evaluating the Impacts of Osmotic and Oxidative Stress on Common Carp (*Cyprinus carpio*, L.) Sperm Caused by Cryopreservation Techniques, *Biology of Reproduction*, 83:852-858
- Lucentini, L., A. Palomba, H. Lancioni, L. Gigliarelli, M. Natali and F. Panara. 2006. Microsatellite Polymorphism in Italian population of northern pike (*Esox Lucius* L.), *Fisheries Research*, 80: 251-262.
- Markova, S. R. Šanda, A. Crivelli, S. Shumkam, I. Wilson, J. Vukic, P. Berrebi and P. Kotlik. 2010. Nuclear and mitochondrial DNA sequence data reveal the evolutionary history of *Barbus* (Cyprinidae) in the ancient lake systems of the Balkans. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55: 488-500
- Martínez-Páramo, S., Pérez-Cerezales, S., Gómez-Romano, F., Blanco, G., Sánchez, J. A., Herráez, M. P., 2009, Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. *Theriogenology*. 71:594-604.
- Meffe, G. K., and C.R. Carroll. 1997. Genetics: conservation of diversity within species. In principles of conservation biology, eds. G. K. Meff C. R. Carrol, pp. 161-201. Sunderland, Ma: Sinauer Associates, Inc: Publisher.
- Mehrdadi, N., Ghobadi, M., Nasrabadi, T., Hoveidi, H. 2006. Evaluation of the quality and self purification potential of Tajan river using QUAL2E model. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 3(3)
- Miller, M.P., 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3. A window program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computersoftware distributed by author.
- Murgia, R., G. Tola, S.N. Archer, Vallergera and J. Hirano. 2002. Genetic identification of grey mullet species (*Mugilidae*) by analysis of mitochondrial DNA sequence: application to identify the origin of processed ovary products (bottarga). *Marine Biotechnol*, 4: 119-126.
- Nahiduzzamana, Md., Hassan, M., Roy, P.K., , A., Hossain, M.A.R., Tiersch, T.R., 2012, Sperm cryopreservation of the Indian major carp, *Labeo calbasu*: Effects of cryoprotectants, cooling rates and thawing rates on egg fertilization, *Animal Reproduction Science*. 136:133- 138
- Naylor, RL.,Goldburg, RJ., Primavera, JH., Kautsky, N., Beveridge, MC., Clay, J. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*. 405(6790): 1017-24
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106:283-292.
- Nguyen, V.H. and S.V. Ngo. 2001 . Vietnamese freshwaters fish, cyprinid famil. Agriculture publish house, Hanoi, Vietnam.
- Nerbonne, BA.,Vondracek, B. 2001. Effects of local land use on physical habitat, benthic macroinvertebrates, and fish in the Whitewater river, Minnesota, USA, *Environmental Management*. 28(1): 87-99
- Ninhaus-Silveira, A.: Foresti, F.; Tabata, Y. A.; Rigolino, M. G. and Veríssimo-Silveira, R. 2006. Cryopreservation of semen from functional sex-reversed genotypic females of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*.
- Noroozrajab, A., Ghorbani, R. and Nabavi, E. 2013. The Impact of Rainbow Trout Farm Effluents on Water Physicochemical Properties of Daryasar Stream. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 5 : 342-346.
- Ogier de Baulny, B., Le Vern, Y., Kerboeup, D., Maisse, G., 1997, Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity infresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa, *Cryobiology*, 34:141-149
- Ogren, SA. 2014. Using indicators of biotic integrity for assessment of stream condition. *Michigan Tech*. 7(5):10-9
- Osvaldo J. S.Villet a, M. Alexander, B. Ford and A. Carol. 2007. Population genetic diversity and phylogeographic divergence patterns of the yellow perch (*Perca flavescens*). *Journal of Great Lakes Research*, 35:107-119.
- Patimar, R., Kiaalvandi, S., Faramarzi, M. 2012. Length- weight relationship of three fish species of Cyprinidae in Tajan river, Iran. *World*. 4(5): 509-511
- Qane, A. Identifying macroinvertebrates population structure of Chaf-roudriver in Guilan province regarding some water qualitative factors (within Urmalmalal village Boundary). Msc.: Teaching training university, 2004. p. 98. (Translate in Persian)
- Rani, K.U., Munuswamy, N., 2014, Preliminary studies on the cryopreservation of spermatozoa in the fresh water fish common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Journal of Coastal Life Medicine*. 2: 181-186
- Rezvani gilkolaei, S., A. imanifar, R. Aghili and F. Laloei. (2007). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of *Rutilus rutilus* population on the southern coast of the Caspian Sea, Iran. *J. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. , 86:1463-1467

- Rico, C., K.M. Ibrahim, I. Rico and G.M. Hewitt. 1997. Stock composition in North Atlantic population of whiting using microsatellite markers. *Journal of Fish Biology*, 51: 462-475.
- Rideout, R. M.; Trippel, E. A.; Litvak, M. K., 2004: The development of haddock and Atlantic cod sperm cryopreservation techniques and the effect of sperm age on cryopreservation success. *Journal of Fish Biology*. 65: 299-311.
- Ryman, N., 1991. Conservation genetics considerations in fishery management. *Journal of Fish Biology*, 39 (Supplement A) 211-224.
- Sadeghi, SH., Gharemahmudli, S., Khaledi, DA., Kheirfam, H., Kiani, HM., Saeidi, P. 2014. Effect of river sand and gravel mining on monthly changeability of suspended sediment concentration. *Water and soil conservation*. 3(3): 14-27
- Saeedi, M., A. R. Karbasi, GH. R. Bidhendi, & N. Mehrdadi, 2006. Human activities Influencing heavy metals Accumulation in Tajan river water in Mazandaran province, *Ecology journal*, 40: 41-50. (Translate in Persian)
- Sansone, G., Fabbrocini, A., Ieropoli, S., Langellotti, A., Occidente, M., Matassino, D., 2002, Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) spermatozoa after thawing. *Cryobiology*. 44: 229-239.
- Sarvi, K., Niksirat, H., Mojazi Amiri, B., Mirtorabi, S.M., Rafiee, G.R., Bakhtiyari, M., 2006, Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) *Aquaculture*, 256: 564-569.
- Scott, JC. 1998. Seeing like a state: How certain schemes to improve the human condition have failed. Yale University Press.
- Seeb, L.W., J.E. Seeb and J.J. Polovina. 1990. Genetic variation in highly exploited spiny lobster *Panulirus marginatus* populations from the Hawaiian Archipelago. *Fish Bulltain*, 88:713-718.
- Sepulveda-Villet, O.J., A.M. Ford, J.D. Williams and C.A. Stepien. 2009. Population genetic diversity and phylogeographic divergence patterns of the yellow perch (*Perca flavescens*). *Journal of Great Lakes Research*, 35: 107-119.
- Sharghi, A., Abdoli, A., Rahmani, H., Shahraki, M. 2011. Assessing of environmental impacts from Shahid-rajai sink on biota. *Oceanography*. 7: 21-27
- Sharma, K.K. and Chowdhary, S., 2011. Macroinvertebrate assemblages as biological indicators of pollution in a Central Himalayan River, Tawi(J&K). *International Journal of Biodiversity and Conservation*. 3(5), 167-174pp.
- Shokri, M., Rossaro, B., Rahmani, H. 2014. Response of macroinvertebrate communities to anthropogenic pressures in Tajanriver . Iran. *Biologia*. 69(10): 1395-1409
- Smakhtin, V. 2002. Environmental water needs and impacts of irrigated agriculture in river basins. A Framework for a New Research Program IWMI Working Paper. 42
- Slechtova, V., V. Slechta, M. Flajshans and D. Gela. 2002. Protein variability in common carp (*Cyprinus carpio*) breeds in the Czech Republic. *Aquaculture*, 204: 241-242.
- Sourinejad, I., M.R. Kalbassi, A. Pino-Querido, M. Vera, C. Bouza and P. Martinez. 2011. Parentage assignment of progeny in mixed milt fertilization of Caspian brown trout *Salmo trutta aspius* using microsatellite DNA markers: Implications for conservation. *African Journal of Biotechnology*, 10 (26): 5084-5090.
- Thai, B. T., A.A. Pham and G.M. Austin. 2007. Genetic diversity of common carp in vietnam using direct sequencing and SSCP analysis of the mitochondrial DNA control region. *Aquaculture*, 258: 228-240.
- Thai, B. T., T.A. Pham and G.M. Austin. 2006. Genetic diversity of common carp in Vietnam using direct sequencing and SSCP analysis of the mitochondrial DNA control region. - Thompson, G., Swain, J., Kay, M., Forster, C. 2001. The treatment of pulp and paper mill effluent: A review. *Bioresource technology*. 77(3): 275-286
- *Aquaculture*, 258: 228-240.
- Thorpe, J. P. and A.M. Sol- Cave. 1994. The use of allozyme electrophoresis in vertebrate systematics. *Zoologica Scripta*, 23: 8-18.
- Vera, M., I. Sourinejad, C. Bouza, R. Vilas, A. Pino-Querido, M.R. Kalbassi and O. Martinez. 2011. Phylogeography, genetic structure, and conservation of the endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877), from Iran. *Hydrobiologia*, 664: 51-67.
- Varnosfaderany, MN., Ebrahimi, E., Mirghaffary, N., Safyanian, A. 2010. Biological assessment of the Zayandeh Rud river, Iran, using benthic macroinvertebrates. *Limnologica-Ecology and Management of Inland Waters*. 40(3): 226-232
- Walker, SL., Hedley, K., Porter, E. 2012. Pulp and paper environmental effects monitoring in Canada: An overview. *Water Quality Research Journal of Canada*. 37(1): 7-19

- Whitton, B.A. 1975. River ecology. Blackwell scientific publications. Oxford, pp. X+ 72
- Yavas, I., Bozkurt, Y., 2011, Effect of different thawing rates on motility and fertilizing capacity of cryopreserved grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm, Biotechnology & Biotechnological Equipment. 25: 2254-2257
- Yao, Z., Crim, L.W., Richardson, G.F., Emerson, C.J., 2000. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. Aquaculture 181, 361–375.
- Yergeau, E., Lawrence, JR., Waiser, MJ., Korber, DR., Greer, CW. 2012. Next-generation sequencing of microbial communities in the Athabasca river and its tributaries in relation to oil sands mining activities. Applied and environmental microbiology. 78(21): 7626-7637
- Yoon, M., S. Sato, N. Azoma, J.E. Seeb, V. Brykov, L.W. Seeb, N. Varnavskaya, R.L. Wilmot, D.H. Jin, S. Urava, A. Urano and S. Abe. 2007. Congruence of Population Genetic Profiles Obtained from Mitochondrial and Microsatellite DNA Analysis in the Pacific Rim Chum Salmon Populations. North Pacific Anadromous Fish Commission. *Technical Report*, 7: 121-123.
- Yousefian, M., 2011. Evaluation of Genetic Variation Among Endangered Sea Brown Trout Young Fish for restocking to Caspian Sea. *Advances in Environmental Biology*, 5 (9): 2769-2775, ISSN 1995-0756.
- Zar, J.H., 1994, Biostatistical analysis. New Jersey: Prentice-Hall; p:662.
- Zardoya, R., D. Vollmer, C. M Craddock, J. Streelman, T.S. Karl, and A. Meyer. 1996. Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). *Proceedings of the Royal Society biological sciences*, 263: 1589–1598.
- Zhao, N., Z. Shao, W. Ai, B. Zhu, S. Brosse and J. Chang. 2005. Microsatellite assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) genetic variability. *Journal of Applied. Ichthyology*, 21:7-13.
- Zhou, B., F. Zkou, H. Cao, Z. Shoo, N. Zhao, B. May, and J. Chang. 2002. Analysis of genetic variation in the Chine sturgeon, estimating the contribution of artificially produced larvae in a wild population. *Journal of Applied. Ichthyology*. 301-306.

Abstract:

The aim of this study was establish of gene bank on The Caspian Sea bony fish, identification genetic characterization and population of *Barbus brachycephalus caspius*, *Lucioperca lucioperca*, *Rutilus rutilus caspius*, *Rutilus frisi kutum* and *Salmo trutta caspius* in southern part of the Caspian Sea by molecular method (Microsatellites) and formation DNA bank, create of cryopreservation bank of bony fish and the feasibility of creating a natural habitat for spawning of bony fish in the Caspian Sea in order to preserve biodiversity and genetic risk. The results showed that The genetic diversity was significantly different between samples of Golestan (Goegan Gulf), Gilan (Sefidrood, Karganrood and Astara rivers) and Mazandaran (Tajan, Tonekabon, Sardabrood and Chaloos rivers) ($p < 0.05$) and there were different genetic groups. In addition, DNA bank of these species was carried out.

After sperm sampling of *Rutilus frisi kutum* and *Salmo trutta caspius*, their quality were tested and some parameters such as motility, duration of mobility, density, pH and osmolality were measured. The results showed that, percentage of motile sperm, timing motility and sperm density of Caspian trout were higher than those of Caspian kutum but osmolality and pH of Caspian trout were lower than those of Caspian kutum. Over time, the percentage of sperm motility and mobility for both species declined compared with fresh samples. After thawing, percentage of motile sperm and timing motility of Caspian kutum were lower than those factors Caspian trout. The results showed that the sample of Caspian kutum sperm that were diluted by ethylene glycol after thawing and were immotile all of them. However, the samples were diluted by glycerol, after thawing, were alive and motile. According to the results, it seems very important species differences that must be fully considered in the process of freezing sperm. The use of a single protocol would not be successful in cryopreservation because the reaction of sperm against to chemical agents is variable.

Sampling of physical and chemical parameters of water, macrobenthic invertebrates and fish fauna was conducted seasonally in each rivers (Tajan, Haraz, Sardabrood and Chaloos rivers) at selected stations during one year. A total of 53 taxa of macrobenthic invertebrates were identified in the four mentioned rivers. 15 species of fish were determined in the studied rivers that 6 of them were non-native species. All identified fish species were native and the anadromous fish was not catch. The results showed that, the relative abundance of fish species resistant to pollution and hard environmental conditions were much more than sensitive species.

Physicochemical parameters of water, turbidity, nutrients, biodiversity, nutrition functioning group and present or absent of fish species showed that there are significant decrease in water qualities from upstream ratio to downstream and there is not any possibility to natural reproduction of migrated species that are dominant and in danger at downstream. In Shahid- Rajaei dam the maximum relative abundance of fish species belonged to *Capoeta capoeta*, *Luciobarbus capito* and *Squalius cephalus*, respectively. The resurvey of this dam and its upstream have been preparing such a favorable condition that seems there are potential of introduction and inhabitant of some of the in danger fish species as a genetic reserve for biodiversity preservation.

Keywords: Genetic variation, Gene bank, Freezing sperm, Natural reproduction, Shahid-Rajaei dam, Caspian Sea

**Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Caspian Sea Ecology Research
Center**

Project Title: Stablish of gene bank on The Caspian Sea bony fish

Approved Number: 14-73-12-8914

Author: Reza Pourgholam

Project leader Researcher : Reza Pourgholam

Collaborator(s): F. Lalaie, M. Binae, M. Naderi

Advisor(s): M. Yousefian

Supervisor: -

Location of execution: Mazadaran province

Date of Beginning : 2011

Period of execution : 5 Years

Publisher: Iranian Fisheries Science Research Institute

Date of publishing : 2017

**All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted
without indicating the Original Reference**

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute -Caspian Sea Ecology Research
Center

Project Title:

Stablish of gene bank on The Caspian Sea bony fish

Project leader Researcher:

Reza Pourgholam

Register NO.

51245